

Aus der Klinik für Strahlendiagnostik

Geschäftsführender Direktor:

Prof. Dr. med. Klaus Jochen Klose

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg in Zusammenarbeit mit
dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Marburg

Formation und Kinetik von DNA-Doppelstrangbrüchen nach Bestrahlung in Abhängigkeit von Kontrastmittelgabe und Bestrahlungstemperatur

Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der
Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Katharina Eble

geb am 30.05.1983 in Tübingen

Marburg, 2011

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität

Marburg am:

11.03.2011

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Matthias Rothmund

Referent: Prof. Dr. med. Dr. rer. physiol. Johannes T. Heverhagen

1. Korreferent: PD Dr. rer. nat. Malte Buchholz

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Röntgenverfahren in der Medizin.....	1
1.1.1 Die Entdeckung der Röntgenstrahlung	1
1.1.2 Erzeugung von Röntgenstrahlung	2
1.1.3 Strahlenphysikalische Grundlagen – Wechselwirkung von Strahlung mit Materie	3
1.2 Strahlenschäden an der DNA und ihre Reparatur	4
1.2.1 Ursachen von DNA-Schäden	5
1.2.2 Effekte ionisierender Strahlung auf die Zelle	5
1.2.3 Arten Strahlen-induzierter DNA-Schäden	8
1.2.4 Reparatur von Doppelstrangbrüchen (DSB).....	11
1.2.4.1 Homologe Rekombination (HR)	12
1.2.4.2 Nicht-homologes End-joining (NHEJ)	13
1.2.4.3 Schadenstoleranz	15
1.2.5 DNA-Schäden und Chromatinstruktur	16
1.2.6 Methoden zur Quantifizierung von DNA-Doppelstrangbrüchen	21
2. Zielsetzung.....	22
3. Material und Methoden.....	26
3.1 Material.....	26
3.1.1 Geräte	26
3.1.2 Chemikalien	27
3.1.3 Medien und Waschlösungen.....	28
3.1.4 Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe	28
3.1.5 Blutentnahme.....	28
3.1.6 Sonstige Materialien.....	29
3.2 Methoden	29
3.2.1 Blutentnahme.....	29
3.2.2 Isolation der Lymphozyten	30
3.2.3 Bestrahlung.....	30
3.2.4 Fixierung der Lymphozyten	30
3.2.5 Immunfluoreszenzfärbung	31
3.2.6 Mikroskopische Auswertung.....	31
3.2.7 Statistische Analyse	32
3.3 Versuchsaufbau	32

3.3.1 Zeitplan und Bestrahlungsdosen der Untersuchungen	32
3.3.2 Variation der Umgebungstemperatur.....	33
3.3.3 Kontrastmittel	33
4. Ergebnisse	34
4.1 Formation und Kinetik der γ -H2AX-Foci	34
4.1.1 γ -H2AX-Foci nach in vitro Bestrahlung von humanen Lymphozyten bei 4 °C mit Kontrastmittelgabe	34
4.1.2 γ -H2AX-Foci nach in vitro Bestrahlung von humanen Lymphozyten bei 4 °C ohne Kontrastmittelgabe	36
4.1.3 γ -H2AX-Foci nach in vitro Bestrahlung von humanen Lymphozyten bei Raumtemperatur mit Kontrastmittelgabe	37
4.1.4 γ -H2AX-Foci nach in vitro Bestrahlung von humanen Lymphozyten bei Raumtemperatur ohne Kontrastmittelgabe	39
4.1.5 γ -H2AX-Foci nach in vitro Bestrahlung von humanen Lymphozyten bei 37 °C mit Kontrastmittelgabe	40
4.1.6 γ -H2AX-Foci nach in vitro Bestrahlung von humanen Lymphozyten bei 37 °C ohne Kontrastmittelgabe	42
4.2 Vergleich der Formation von γ -H2AX-Foci in Anwesenheit und Abwesenheit von jodhaltigem Kontrastmittel.....	45
4.3 Vergleich der Formation von γ -H2AX-Foci in Abhängigkeit von der Temperatur bei Bestrahlung	48
5. Diskussion	49
5.1 Formation und Kinetik der γ -H2AX-Foci	49
5.2 Vergleich der Formation von γ -H2AX-Foci in Anwesenheit und Abwesenheit von jodhaltigem Kontrastmittel.....	53
5.3 Vergleich der Formation von γ -H2AX-Foci in Abhängigkeit von der Temperatur bei Bestrahlung	56
5.4 Methodik.....	59
5.5 Ausblick	61
Literaturverzeichnis	63
Anhang.....	78
Zusammenfassung	82
Summary	85
Lebenslauf	88
Verzeichnis der akademischen Lehrer	89
Danksagung.....	90
Ehrenwörtliche Erklärung	91

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Direkte und indirekte Wirkung ionisierender Strahlung.....	6
Abbildung 1-2: Typische Reaktionsprodukte nach Einwirken von ionisierender Strahlung auf DNA-Basen.....	9
Abbildung 1-3: Schematische Darstellung der DSB-Schadensantwort.....	12
Abbildung 1-4: Vergleich NHEJ und HR.....	15
Abbildung 1-5: Modell der Rolle der H2AX-Phosphorylierung in der Chromatinkondensation nahe DNA-Doppelstrangbrüchen.....	20
Abbildung 4-1: Kinetik der γ -H2AX-Foci pro Zelle nach applizierter Röntgenstrahlung in humanen Lymphozyten bei 4 °C und Kontrastmittelgabe.....	35
Abbildung 4-2: Kinetik der γ -H2AX-Foci pro Zelle nach applizierter Röntgenstrahlung in humanen Lymphozyten bei 4 °C ohne Kontrastmittelgabe.....	37
Abbildung 4-3: Kinetik der γ -H2AX-Foci pro Zelle nach applizierter Röntgenstrahlung in humanen Lymphozyten bei Raumtemperatur und Kontrastmittelgabe	38
Abbildung 4-4: Kinetik der γ -H2AX-Foci pro Zelle nach applizierter Röntgenstrahlung in humanen Lymphozyten bei Raumtemperatur ohne Kontrastmittelgabe	40
Abbildung 4-5: Kinetik der γ -H2AX-Foci pro Zelle nach applizierter Röntgenstrahlung in humanen Lymphozyten bei 37 °C und Kontrastmittelgabe.....	41
Abbildung 4-6: Kinetik der γ -H2AX-Foci pro Zelle nach applizierter Röntgenstrahlung in humanen Lymphozyten bei 37 °C ohne Kontrastmittelgabe.....	43
Abbildung 4-7: Lymphozyten mit Anti- γ -H2AX-Immunfluoreszenzfärbung direkt nach in vitro Bestrahlung mit 20, 100, 200, 1000 mGy und ohne Bestrahlung (NK = Negativkontrolle) bei Raumtemperatur mit Kontrastmittel.....	44
Abbildung 4-8: Lymphozyten mit Anti- γ -H2AX-Immunfluoreszenzfärbung direkt nach in vitro Bestrahlung mit 200 mGy bei Raumtemperatur mit und ohne Kontrastmittelgabe	47

Tabellenverzeichnis

Tabelle 4-1: Tabellarische Ergebnisübersicht nach Bestrahlung: 4 °C mit Kontrastmittel	35
Tabelle 4-2: Tabellarische Ergebnisübersicht nach Bestrahlung: 4 °C ohne Kontrastmittel	36
Tabelle 4-3: Tabellarische Ergebnisübersicht nach Bestrahlung: Raumtemperatur mit Kontrastmittel.....	38
Tabelle 4-4: Tabellarische Ergebnisübersicht nach Bestrahlung: Raumtemperatur ohne Kontrastmittel.....	39
Tabelle 4-5: Tabellarische Ergebnisübersicht nach Bestrahlung: 37 °C mit Kontrastmittel	41
Tabelle 4-6: Tabellarische Ergebnisübersicht nach Bestrahlung: 37 °C ohne Kontrastmittel	42
Tabelle 4-7: Vergleich der nach applizierter Röntgenstrahlung in humanen Lymphozyten induzierten γ -H2AX-Foci bei Versuchen mit und ohne Kontrastmittel....	45

1. Einleitung

1.1 Röntgenverfahren in der Medizin

1.1.1 Die Entdeckung der Röntgenstrahlung

Die am 8. November 1895 von Wilhelm Conrad Röntgen entdeckte Röntgenstrahlung sowie die Erkenntnisse über radioaktive Strahlung durch Henri Antoine Becquerel im März 1896, Marie und Pierre Curie im Dezember 1898 (Mould 1998) bilden die Grundlagen Medizinischer Radiologie aus diagnostischer und therapeutischer Sicht (Mould 1995). Röntgen nannte die neu entdeckten Strahlen "X-Strahlung" und veröffentlichte seine Entdeckung unter dem Titel "Über eine neue Art von Strahlung" (Röntgen 1895).

Seit dieser Zeit haben sich die Praktiken in der Medizin stark gewandelt (Lentle et al. 1997). Es werden immer neue Erkenntnisse im Bereich der Forschung und Anwendung verschiedener Strahlenqualitäten gewonnen (Cosset et al. 1995; Pirker 1996).

Die Zeit nach Röntgens Entdeckung ist dadurch geprägt, Untersuchungen schneller, praktischer und sicherer für Untersucher und Patient zu machen und dabei trotzdem immer höhere Bildqualitäten zu erreichen. Stand zu Beginn die Skelettdiagnostik im Vordergrund, so wurden mit der Nuklearen Medizin Möglichkeiten geschaffen, Körperfunktionen genauer zu untersuchen.

Die Erfindung der Computertomographie im Jahr 1971 durch Hounsfield und Cormack stellt nur den Anfang einer bis heute nicht endenden Entwicklung neuer Methoden in der Radiologie dar. Die passive Rolle radiologischer Interventionen in der medizinischen Diagnostik wird durch Untersuchungen wie bildgeführte Biopsien und Drainagen mehr an das Bett des Patienten verlagert. Trotzdem ist bis heute die konventionelle Aufnahme des Röntgenthorax die häufigste Untersuchung in der Medizinischen Radiologie (Lentle et al. 1997).

1.1.2 Erzeugung von Röntgenstrahlung

Die Aufgabe einer Röntgenanlage besteht darin beschleunigte Elektronen in Röntgenstrahlung umzuwandeln. Dabei werden sowohl Bremsstrahlung als auch charakteristische Strahlung erzeugt.

Der Aufbau der Röntgenanlage ist mitbestimmend für Charakteristiken des Röntgenstrahls, zu welchen die Größe des Brennflecks, *x-ray field uniformity* und das Energiespektrum des Röntgenstrahls zählen. Wichtig sind diese Eigenschaften, da dadurch radiologische Parameter wie räumliche Auflösung, Bildkontrast und Patientendosen beeinflusst werden (Zink 1997; Seibert 2004).

Röntgenstrahlen entstehen durch den Aufprall von energiereichen Elektronen, die aus einer beheizten Kathode austreten und durch die angelegte Hochspannung in Richtung Anode beschleunigt werden. Dabei entsteht der überwiegende Teil durch Bremsstrahlung. Treffen energiegeladene Elektronen auf die Anode, wird ein Teil vom positiv geladenen elektrischen Feld der Atomkerne des Anodenmaterials angezogen und abgebremst. Das Elektron ändert seine Richtung und gibt Energie in Form von Röntgenstrahlung ab. Diese ist umso höher, je näher die Interaktion am Zellkern stattfindet. Die maximal mögliche Energie der Röntgenstrahlung wird erreicht, wenn ein Elektron direkt mit dem Zellkern kollidiert und dabei seine komplette Energie abgibt. Durch die entstandenen Photonen unterschiedlicher Energie ergibt sich ein kontinuierliches Bremsstrahlspektrum (Zink 1997; Seibert 2004), dessen Maximalenergie von der Röhrenspannung vorgegeben ist (Reiser et al. 2004).

Durch den Aufprall des freien Elektrons wird dem Hüllelektron Energie übertragen, so dass es von einem kernnahen auf ein kernfernes Orbital angehoben (Anregung) oder aus dem Atomverband herausgeschleudert wird (Ionisation). Die angeregten Atome der Anode gehen unter Aussendung charakteristischer Strahlung wieder in den Grundzustand über.

Für die verschiedenen Elemente finden sich charakteristische Energien der Röntgenstrahlen, die als Linienspektrum das kontinuierliche Energiespektrum überlagern (Zink 1997; Seibert 2004). Röntgenstrahlung wird anhand der Energie in weiche ($< 100 \text{ keV}$), harte ($100 \text{ keV}-1 \text{ MeV}$) und ultraharte Strahlung ($> 1 \text{ MeV}$)

eingeteilt. Je höher die Röhrenspannung, desto kleiner die Wellenlänge und desto härter der Röntgenstrahl. Durch Filterung wird der niederenergetische Anteil der Strahlung reduziert. Die Folge ist die Aufhärtung der Strahlung (Reiser et al. 2004).

1.1.3 Strahlenphysikalische Grundlagen – Wechselwirkung von Strahlung mit Materie

In der medizinischen Radiologie wird ionisierende Strahlung (*ionizing radiation; IR*) verwendet. Bei der Wechselwirkung von Strahlung mit Materie wird Energie auf Atome übertragen, was zur Anregung oder Ionisation führt (= Primärprozesse).

Prinzipiell wird IR in Teilchenstrahlung (Korpuskelstrahlung) und elektromagnetische Strahlung unterschieden. Röntgenstrahlen zählen wie auch die Gammastrahlung zur Photonen- bzw. elektromagnetischen Wellenstrahlung.

IR wird weiter in direkt und indirekt ionisierend unterschieden. Direkt ionisierend sind elektrisch geladene Korpuskel, die durch Zusammenstoß mit Elektronen unmittelbar zu Anregung und Ionisation führen. Indirekt ionisierend sind ungeladene Korpuskel, Röntgenstrahlung und Gammastrahlung. Beim Durchtritt durch Materie kommt es zur Streuung oder Absorption. Es werden geladene Korpuskeln erzeugt, die durch Zusammenstöße mit Hüllelektronen zu Anregung und Ionisation führen.

Zu den grundlegenden Wechselwirkungsprozessen indirekt ionisierender Strahlung zählen der Photoeffekt und Compton-Effekt, die in der Röntgendiagnostik die größte Rolle spielen, die Klassische Streuung (kohärente oder Rayleigh-Streuung) und die Paarbildung.

Bei niederenergetischer Röntgenstrahlung (< 60 kV) dominiert der photoelektrische Effekt. Dabei kommt es bei der Interaktion eines Photons mit einem Hüllelektron der inneren Schalen (meistens K-Schale) zur Übertragung der Energie auf das Elektron welches sich aus der Hülle löst (Ionisation) und als Sekundärelektron weitere Ionisationen bewirken kann. Die Schale wird durch ein Elektron einer äußeren Schale aufgefüllt. Dabei wird charakteristische Strahlung oder (seltener) ein Auger-Elektron emittiert. Die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten des Photoeffekts wird durch eine

hohe Ordnungszahl des durchstrahlten Gewebes und niederenergetisch weiche Strahlung begünstigt.

Bei hochenergetischer Strahlung (zwischen 60 keV und 20 MeV) dominiert der Compton-Effekt. Trifft ein Photon auf ein Hüllelektron überträgt es einen Teil seiner Energie auf dieses, wird in einem Winkel von 0-180° gestreut und kann anschließend weitere Ionisationen verursachen. Das Elektron entfernt sich im Winkel von 0-90° aus der Hülle, um beim Auftreffen auf andere Atome oder Moleküle ebenfalls Ionisationen zu verursachen. Abhängig ist der Effekt von der Dichte des Materials wobei die Ordnungszahl kaum eine Rolle spielt.

Bei der klassischen Streuung interagiert das einfallende Photon mit einem Elektron und verändert dabei seine Richtung ohne Energie abzugeben. Die Wahrscheinlichkeit steigt mit wachsender Ordnungszahl und Dichte und sinkt je höher die Energie der Röntgenstrahlung ist. Klassische Streuung findet bis 10 keV statt.

Paarbildung findet bei Energien von mindestens 1,02 MeV statt und kommt in der Röntgendiagnostik und -therapie nicht vor (Reiser et al. 2004; Seibert et al. 2005; Kauffmann et al. 2006)

Folge der verschiedenen Wechselwirkungen sind die Schwächung der Strahlung und die Entstehung von Streustrahlung.

Die Wirkung ionisierender Strahlung auf Zellen wird hauptsächlich durch Sekundärelektronen hervorgerufen, die durch die beschriebenen Wechselwirkungen eine Vielzahl weiterer Moleküle anregen oder ionisieren. Dadurch werden chemische und biochemische Prozesse (Sekundärprozesse) in Gang gesetzt, die in Abschnitt 1.2.2 genauer erläutert werden.

1.2 Strahlenschäden an der DNA und ihre Reparatur

Nukleinsäuren sind aus Nukleotiden zusammengesetzte Makromoleküle (Polynukleotide), bestehend aus einer Base, dem Zucker Ribose und Phosphat. Zwei Polynukleotidstränge lagern sich antiparallel zusammen. Nach dem Modell von Watson und Crick liegt die DNA als Doppelhelix vor. Im Kern einer eukaryotischen Zelle

ist sie durch Interaktion mit Histonproteinen in einer kondensierten Überstruktur, dem Chromatin, organisiert.

Die DNA ist der Träger der Erbinformation. Sie enthält Gene, die für die gesamten Proteine einer Zelle kodieren und ermöglicht so die Aufrechterhaltung des zellulären Stoffwechsels.

Die Sicherung der Stabilität der DNA und der auf ihr kodierten Informationen ist Voraussetzung für die Erfüllung dieser Aufgaben.

1.2.1 Ursachen von DNA-Schäden

Man unterscheidet zwischen endogenen und exogenen Schäden an der DNA.

Exogene Schäden entstehen z.B. durch Einwirkung ionisierender oder ultravioletter Strahlung. Endogene Schäden entstehen spontan oder durch freie Radikale, die im Stoffwechsel entstehen (Friedberg 2003; Valerie et al. 2003).

Der Metabolismus innerhalb der DNA mit Replikation, Rekombination und Reparatur zeigt den dynamischen Zustand der DNA. In lebenden Organismen gibt es zahlreiche verschiedene Schäden an der DNA (Friedberg 2003). Im Rahmen dieser Arbeit soll genauer auf die Schäden nach Einwirkung ionisierender Strahlung eingegangen werden.

1.2.2 Effekte ionisierender Strahlung auf die Zelle

Bei der Wirkung ionisierender Strahlung auf die DNA wird zwischen direkten und indirekten Effekten unterschieden (Friedberg et al. 2007).

Bei direkten Effekten kommt es durch ein Sekundärelektron, welches nach Absorption eines Photons durch ein Atom oder Molekül entstanden ist, zur Wechselwirkung direkt mit der DNA (Hall 2000). Das führt zur Ionisation von Basen und Zuckern an der DNA (Ward 1988).

Indirekte Effekte entstehen, wenn das entstandene Sekundärelektronen nicht mit der DNA direkt sondern mit Wasser oder anderen umgebenden Molekülen reagieren. Dabei entstehen reaktive Spezies, die anschließend mit der DNA reagieren können (Friedberg et al. 2007).

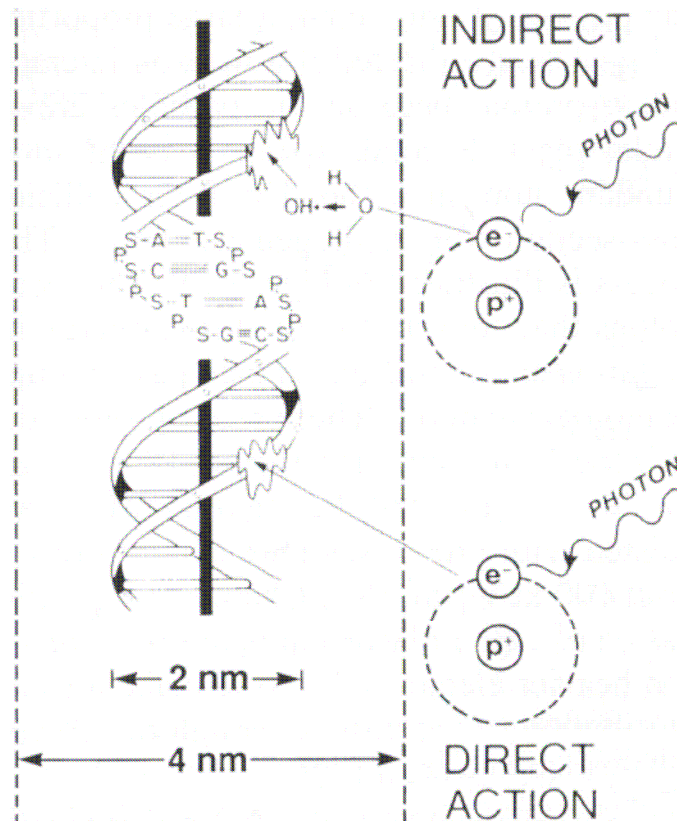


Abbildung 1-1: **Direkte und indirekte Wirkung ionisierender Strahlung.**

Beim direkten Effekt wechselwirkt ein Sekundärelektron, welches durch Absorption eines Photons durch ein Atom oder Molekül entstanden ist, direkt mit der DNA. Beim indirekten Effekt wechselwirkt das Sekundärelektron mit z.B. einem Wassermolekül, was zur Entstehung von Hydroxylradikalen (OH•) führt. Diese Hydroxylradikale können nun Schäden an der DNA hervorrufen. Bei dicht ionisierender Strahlung überwiegt der direkte Strahleneffekt, bei dünn ionisierender Strahlung der indirekte Effekt.

(S = Zucker; P = Phosphat; A = Adenin; C = Cytosin; G = Guanin; T = Thymin) (aus Hall 2000)

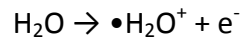
Die pro Wegstrecke abgegebene Energie wird mit dem LET (linear energy transfer) beschrieben (Goodhead 1989). α -Strahlung erzeugt tausende von Ionisationen bei Durchtritt durch den Zellkern und hat im Vergleich zu γ - und Röntgenstrahlen einen hohen LET Wert. Für Strahlung mit niedrigem LET gilt, dass 65 % der DNA-Schäden indirekt entstehen. Nur 35 % lassen sich auf direkte Effekte zurückführen (Friedberg et al. 2007).

Da Zellen zu 80 % aus Wasser bestehen, sind Spezies, die bei der Radiolyse von Wasser entstehen, die Hauptquelle für indirekte Schäden an der DNA (Ward 1988; Riley 1994).

Dabei werden zwei primäre Reaktionen unterschieden:

1. 80 % der Energie ionisierender Strahlung fällt auf diese Reaktion.

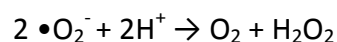
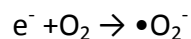
Trifft ein Photon mit ausreichender Energie auf ein Wassermolekül wird dieses ionisiert:



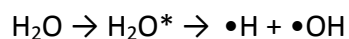
Durch Abgabe eines Protons entsteht ein Hydroxylradikal ($\bullet\text{OH}$):



e^- kann mit Basen der DNA reagieren. In lufthaltigen Flüssigkeiten reagiert es mit Sauerstoff zu einem Superoxidradikal ($\bullet\text{O}_2^-$). Durch eine weitere Reaktion können Hydrogenperoxide (H_2O_2) entstehen:



2. Bei dem zweiten möglichen Weg wird ein Wassermolekül aktiviert und zerfällt danach in zwei Radikale:



Nur 20 % der absorbierten Energie in einer Zelle fallen auf diese Reaktion.

Das Resultat dieser Prozesse ist die Bildung dreier reaktiver Spezies in Wasser: $\bullet\text{OH}$, $\bullet\text{H}$ und e^- wobei das Hydroxylradikal für Schäden an der DNA am bedeutensten ist.

Die relative Häufigkeitsverteilung der DNA-Schäden auf direkte und indirekte Mechanismen ist deutlich auf die Seite der direkten DNA-Schäden verschoben, da der größte Teil der Radiolyseprodukte des Wassers nicht mit der DNA, sondern mit anderen Bestandteilen der Zelle - z.B. Proteinen oder Lipiden - weiterreagiert. Während annähernd 99 % der Strahlungsenergie auf die Radiolyse des Wassers entfallen, entstehen nur circa zwei Drittel der DNA-Schäden auf diesem Weg. Das übrige Drittel der DNA-Schäden wird durch direkte Einwirkung der ionisierenden Strahlung auf die DNA verursacht (Friedberg et al. 2007).

1.2.3 Arten Strahlen-induzierter DNA-Schäden

Durch die Einwirkung ionisierender Strahlung können zahlreiche verschiedene Schäden an der DNA induziert werden (Hutchinson 1985; Teoule 1987; Ward 1988; Goodhead 1989; Lett 1990; Ward 1990; Riley 1994;).

Mögliche Veränderungen finden sich an allen Bestandteilen der DNA. Beispiele sind Proteinquervernetzungen, Veränderungen an Basen und Zuckern der DNA sowie Einzel- und Doppelstrangbrüche (Frankenberg-Schwager 1990). Die Schäden treten isoliert oder gehäuft in der DNA auf, wobei letztere als "komplexe Schäden" bezeichnet werden (Iliakis 1991).

In Studien konnte gezeigt werden, dass Hydroxylradikale besonders C5=C6 - Doppelbindungen in Pyrimidinen angreifen. So entstehen unter aeroben Bedingungen Basenveränderungen wie z.B. Thyminglykole (Ward 1988). Durch weitere Fragmentierung des Rings entstehen Verbindungen wie Methylaronylurea, 5-Hydroxyhydrantoin, N-formamidoharnstoff und Harnstoff (Teoule 1987). Unter anaeroben Bedingungen führen Veränderungen zu den Produkten 5-Hydroxythymine und 6-Hydroxy-5,6-dihydrothymine (Breimer et al. 1985; Friedberg et al. 2007).

Verschiedene Basenmodifikationen finden sich an Purinen (Friedberg et al. 2007). Purinreste können zyklisieren. Produkte wie z.B. 8,5'-cyclodeoxyguanosin oder 8,5'-cyclodeoxyadenosin deformieren die normale Doppelhelixstruktur der DNA (Cadet et al. 1985; Dizdaroglu et al. 1987).

Beispiele für durch ionisierende Strahlung verursachte Basenveränderungen sind in Abbildung 1-2 dargestellt.

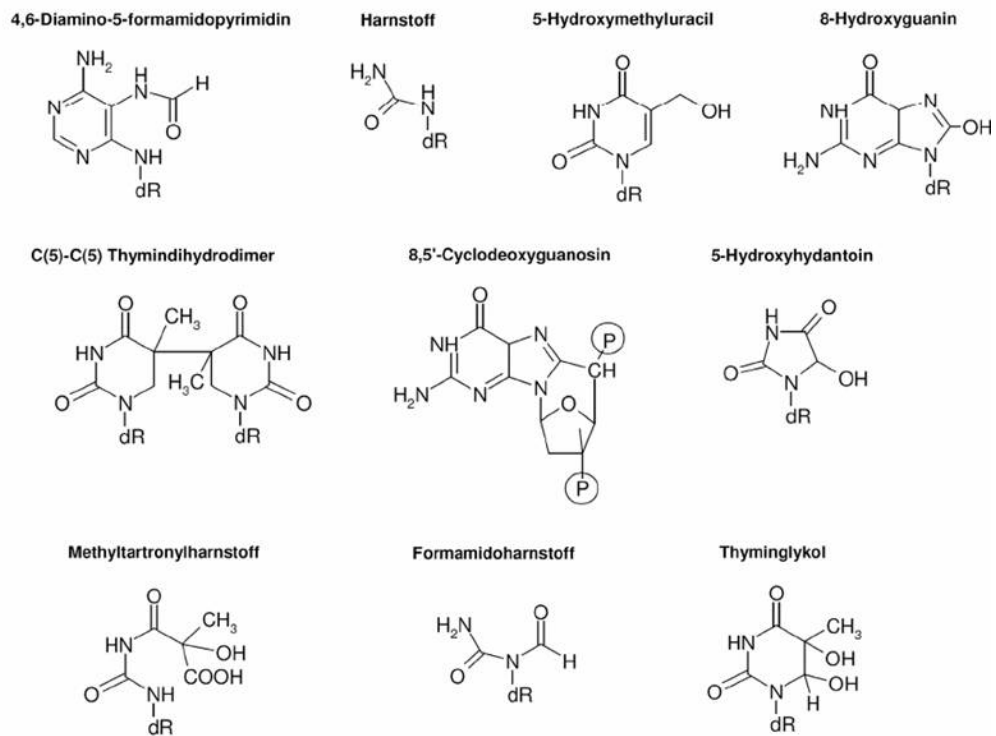


Abbildung 1-2: Typische Reaktionsprodukte nach Einwirken von ionisierender Strahlung auf DNA-Basen (nach Friedberg et al., 2007)

Durch Ionisierende Strahlung kann es zur Ausbildung von Dimeren zwischen Basen wie z.B. Thymidin-Dimeren kommen, was die DNS-Synthese beeinträchtigt und im schlimmsten Fall das Absterben der Zelle bewirken kann (SETLOW et al. 1963; Prakash et al. 2002).

Wenn Hydroxylradikale mit den Zuckern der DNA reagieren kann es zu Strangbrüchen an der DNA kommen. Durch direkte Ionisation oder Reaktion eines Hydroxylradikals mit der Desoxyribose des Zucker-Phosphat-Rückrats der DNA kann es zur Entstehung eines Desoxyribose-Radikals kommen (Breen et al. 1995). Über vielfältige Mechanismen kann dieses Radikal zur Ausbildung eines Einzelstrangbruches führen (Friedberg et al. 2007).

Ungefähr 20 % der Radikale welche mit der DNA reagieren, attackieren deren Zucker-Phosphat-Rückrat. So verursacht 1 Gray Strahlung mit niedrigem LET (γ - oder x-Strahlung) in einer Zelle ca. 600-1.000 DNA-Einzelstrangbrüche und ca. 16-40 DNA-Doppelstrangbrüche, verglichen mit 250 Thyminveränderungen (Ward 1988).

Locally multibly damaged sites (LMDS) sind Anhäufungen von Basenschäden und Schäden des Zucker-Phosphat-Rückrats im Bereich weniger nm. Sie entstehen, wenn eine große Menge Energie auf kleinen Raum abgegeben wird wobei es zu einer Anhäufung von Hydroxylradikalen kommt. Die Radikale haben eine begrenzte Reichweite und sind hochreaktiv, so dass es zu einer Anhäufung von Schäden im Bereich weniger Basenpaare kommt (Friedberg et al. 2007). Die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von LMDS erhöht sich mit der Dosis und dem LET der Strahlung (Holley et al. 1996; Rydberg 1996). Dabei ist die Dosis definiert als absorbierte Energie pro Masse und wird in der Einheit Gray (Gy) angegeben.

Doppelstrangbrüche sind ein Beispiel für diese Art von Schäden (Hutchinson 1985; Iliakis 1991). Sie entstehen, wenn das Zucker-Phosphat-Rückrat beider Stränge durch direkte Ionisation oder der Einwirkung von Hydroxylradikale im Bereich von etwa 10 bp geschädigt wird. Da die meisten Strangbrüche untypische Enden aufweisen können sie nicht durch einen einfachen Ligationsschritt repariert werden. Im Bereich der Enden finden sich weitere DNA-Schäden. Häufig fehlt die OH Gruppe am 3'Ende, Phosphatgruppen oder Basen (Obe et al. 1992; Goodhead 1994).

Da die genaue Morphologie von LMDS nicht genau definiert ist, stellt die Reparatur dieser "komplexen Schäden" ein weit größeres Problem dar als die Reparatur isolierter Schäden (Iliakis 1991).

1.2.4 Reparatur von Doppelstrangbrüchen (DSB)

Für die unterschiedlichen Schäden an der DNA existieren zahlreiche Reparatursysteme, um die Integrität des Genoms zu gewähren (Friedberg 1995).

Im Rahmen dieser Arbeit soll die Reparatur von Doppelstrangbrüchen (DSB) an der DNA genauer betrachtet werden.

DSB werden in der Natur bei verschiedenen Prozessen wie der Rekombination während der Meiose, der VDJ-Rekombination zur Herstellung von T-Zell-Rezeptor- und Immunglobulinen, gezielt gebildet. Durch ständige Aktivität der Reparaturmechanismen auf niedriger Stufe stellen diese DSB kein Problem für die Zelle dar (Shiloh 2003).

Demgegenüber stehen DSB durch schädigende Agentien. Sie gehören zu der Gruppe schwerster Schäden an der DNA. Ohne weitere Reparatur kommt es zum Zelltod (Valerie et al. 2003). Fehlerhafte Reparaturen können die Entstehung chromosomaler Translokationen und genomischer Instabilität bedingen, was zur Entartung der Zellen führen kann (Elliott et al. 2002; Thompson et al. 2002).

Durch das Auftreten von DSB werden Signal-Transduktions-Kaskaden aktiviert (s. Abbildung 1-3). Sensoren erkennen den Schaden an der DNA und übermitteln ihre Information an Transducer-Proteine. Diese verstärken das Signal und leiten es weiter an Effektor-Proteine, die verschiedene Schadensantworten aktivieren können. Bei irreparablen Schäden kommt es zur Apoptose der Zelle. Verschiedene Reparaturmechanismen können aktiviert werden. Durch einen Zellzyklusarrest verlängert sich die Zeit für eine Reparatur der DSB (Zhou et al. 2000; Khanna et al. 2001; Shiloh 2003).

Die zwei Hauptmechanismen bei der Reparatur der DSB sind die Homologe Rekombination (HJ) und das Nicht-homologe Endjoining (NHEJ) (s. Abbildung 1-4) (Haber 2000; Karran 2000; van Gent et al. 2001).

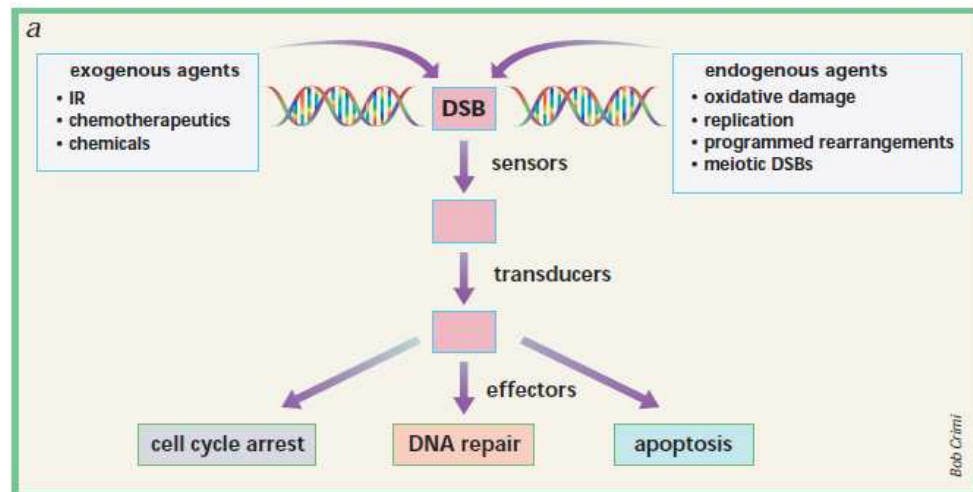


Abbildung 1-3: Schematische Darstellung der DSB-Schadensantwort. DSB werden von Sensor-Proteinen erkannt. Über eine Signalkaskade von Transducer-Proteinen wird das Signal verstärkt und an die Effektor-Proteine weitergeleitet, welche einen Zellzyklus-Arrest, die DSB-Reparatur oder die Apoptose, aktivieren. (aus: Khanna und Jackson 2001)

1.2.4.1 Homologe Rekombination (HR)

Die Reparatur von DSB mittels HR erfolgt mit Hilfe homologer DNA Sequenzen. Dabei dient entweder das intakte Schwesterchromatid oder das homologe Chromosom als Matrize. DSB werden weitestgehend fehlerfrei repariert.

In Prokaryoten und niedrigen Eukaryoten stellt die HR den Hauptreparaturmechanismus dar und findet in allen Zellzyklusphasen statt (Dudas et al. 2004). In höheren Eukaryoten zeigt HR die höchste Aktivität in der S- und G2-Phase (Valerie et al. 2003).

Wichtig für den Prozess der HR sind die Rad52 Gruppen-Gene (Rad50, Rad51, Rad52, Rad54, Rdh54/Tid1, Rad55, Rad57, Rad59, Mre11, und Xrs (Nbs)) (Symington 2002). Der initiale Schritt ist die nukleolytische Prozessierung der Bruchenden, durch welche einzelsträngige 3'Überhänge entstehen. Für die Erkennung der Bruchenden wird der MRN Komplex bestehend aus Mre11, Rad50 und Nbs1 benötigt (Constanzo et al. 2001; Krogh et al. 2004; Shrivastav et al. 2008). An das 3'Ende bindet das Einzelstrang-Bindeprotein RPA, welches durch Rad51 in einer Reaktion ersetzt wird, die durch Rad52, Rad55 und Rad57 vermittelt wird (Sung et al. 2003; Shivji et al. 2004;

Shrivastav et al. 2008). Es kommt zur Invasion des Rad51 Nukleoprotein-Filaments in den homologen DNA-Bereich (West 2003). Durch Neusynthese anhand der homologen Matrize wird das 3'Ende durch die DNA-Polymerase verlängert. Nach Ligation der Enden durch die DNA-Ligase kommt es zur Auflösung der *Doppel-Holliday-Struktur*, wobei *Crossovers* auftreten können.

Für diesen letzten Schritt existieren noch weitere Variationen im Prozess der HR. Beim *synthesis-dependent strand annealing (SDSA)* bindet das eingewanderte Filament nach der Elongation den nicht eingewanderten Überhang an der gegenüberliegenden Seite des DSB (Shrivastav et al. 2008). Bei DSB in nahe beieinanderliegenden repetitiven Sequenzen kann die Reparatur durch *single-strand annealing (SSA)* erfolgen. Dabei können sich die DSB-Enden nach Resektion anhand der repetitiven Sequenzen paaren. Die Ligation der Bruchenden findet unter Verlust genetischer Information statt. Wenn ein DSB nur ein Ende aufweist kommt es zur Bruch-induzierten Replikation (BIR) (Paques et al. 1999; Haber 2000; Sung et al. 2006).

Defekte in Proteinen, die für den regulären Ablauf der HR benötigt werden, sind häufig embryonal letal. Zellen mit nicht-letalen Defekten zeigen chromosomale Instabilität und die betroffenen Organismen eine erhöhte Krebsdisposition. Dies zeigt, dass HR auch in Säugerzellen eine wichtige Rolle bei der chromosomalen Stabilität spielt (Valerie et al. 2003).

1.2.4.2 Nicht-homologes End-joining (NHEJ)

In höheren Eukaryoten ist das NHEJ der vorherrschende Reparaturmechanismus. Es findet im Zellzyklus in allen Stadien statt und ist in der G0/G1-Phase der einzige Reparaturweg (Haber 2000; van Gent et al. 2001; Lieber 2008).

Das Prinzip des NHEJ ist die direkte Verknüpfung der Bruchenden für die keine homologen Sequenzen benötigt werden.

Das NHEJ ist selten fehlerfrei. Mikrodeletionen und Fehlverknüpfungen an den Bruchstellen können vorkommen (Jackson 2002; Sonoda et al. 2006).

An die Bruchenden bindet zunächst das Ku-Heterodimer bestehend aus Ku70 und Ku80. Dieses besitzt die Fähigkeit mit den verschiedenen für das NHEJ benötigten Enzymsystemen zu interagieren. Dazu gehören eine Nuklease (Artemis-DNA-PK_{cs}),

Polymerasen (μ oder λ) und eine Ligase (XLF/XRCC4/DNA Ligase IV) (Lieber 2008).

Artemis und die katalytische Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase (DNA-PK_{cs}) liegen als Komplex in Zellen vor (Ma et al. 2002) und binden an die Ku gebundenen DNA-Enden. Durch die Bindung wird die Serin/Threonin-Kinaseaktivität der DNA-PK_{cs} aktiviert (Hammarsten et al. 2000). Diese Aktivierung führt zur Autophosphorylierung der DNA-PK_{cs} (Ma et al. 2002; Meek et al. 2004) wodurch die Zugänglichkeit an DNA-Enden erleichtert wird. DNA-PK_{cs} phosphoryliert weitere Reparaturproteine wie den Ligasenkomplex der rekrutiert wird und Artemis. Dadurch funktioniert Artemis als 5'- oder 3' Endonuklease und wird für die Prozessierung an DSBs-Enden benötigt, die durch ihre Komplexität nicht ligiert werden können (Burma et al. 2006; Jovanovic et al. 2006; Niewolik et al. 2006; Uematsu et al. 2007; Lieber 2008). μ , λ Polymerasen und die terminale Deoxynukleotidyltransferase (TdT) helfen bei der Reparatur durch NHEJ u.a. durch Überbrückung der Lücken zwischen den DNA Enden. Die Bruchenden werden durch die Ligase IV ligiert. Diese bildet einen Komplex mit XRCC4 und XRF welche zur Effizienz der Ligase beitragen (Lieber 2008).

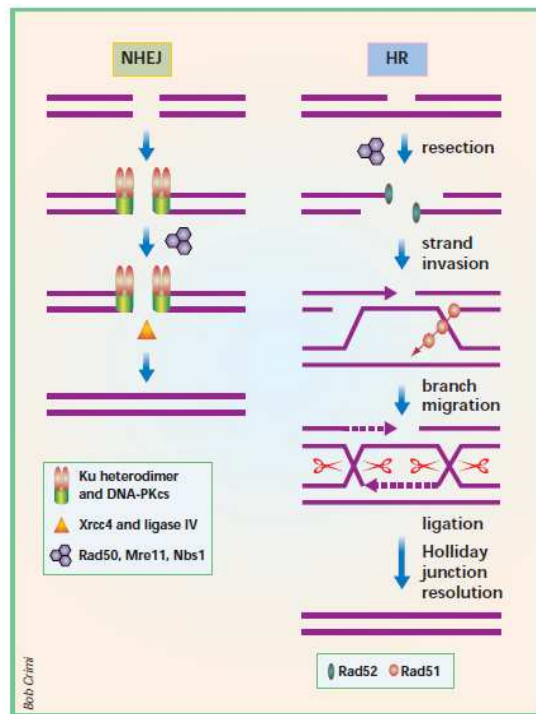


Abbildung 1-4: Vergleich der beiden Wege der DSB-Reparatur. NHEJ verbindet die beiden Bruchenden direkt, führt aber im Allgemeinen zu kleinen Deletionen. NHEJ erfordert das DNA-Enden-bindende Protein Ku, welches die DNA-PKCS rekrutiert. Anschließend wird Xrcc4 zusammen mit der DNA-Ligase IV rekrutiert. Der Rad50-Mre11-Nbs1-Komplex, der eine Helikasen- und eine Exonukleasenaktivität besitzt, hat möglicherweise ebenfalls eine Funktion beim NHEJ, besonders wenn die DNA-Bruchenden vor der Ligierung prozessiert werden müssen. Homologe Rekombination (HR) erfordert Rad52, ein DNA-Enden-bindendes Protein, und Rad51, welches Filamente um den entwundenen DNA-Strang bildet, um die Stranginvasion zu ermöglichen. Das gebrochene 3'-Ende infiltriert einen homologen DNA-Doppelstrang und wird mittels DNA-Polymerase erweitert. In meiotischen Zellen werden die Enden durch die DNA-Ligase I ligiert und die verwundenen DNA-Stränge (Holliday-Strukturen) werden entzerrt. Dies führt entweder zu Crossing over- oder zu nicht Crossing over-Genprodukten (Khanna et al. 2001).

1.2.4.3 Schadenstoleranz

Neben DNA-Reparatur, Apoptose und Zellzyklusarrest stellt die Schadenstoleranz einen weiteren Mechanismus dar mit dem die Zelle auf DSB reagiert.

Einige DNA-Läsionen persistieren bis zur Replikation des Genoms. Faktoren die zur Persistenz führen sind: a) ein hoher Grad an Schäden; b) schlecht reparierte Schäden;

c) uneffizient reparierte genomische Regionen und d) DNA-Schäden während der S-Phase des Zellzyklus. Um die Replikation trotz dieser Schäden zu gewährleisten haben Zellen die Fähigkeit zur Schadenstoleranz entwickelt. Dieser liegen zwei Hauptmechanismen zugrunde: 1.) *template switching* und 2.) *lesion bypass* (Wang 2001). Erst genannter wird auch als "*postreplication repair*" bezeichnet (Prakash 1981) und ursprünglich von Higgins et al. als Mechanismus in Säugetierzellen benannt (Higgins et al. 1976). Die Synthese der dsDNA wird durch eine Läsion an einem der Matrizenstränge, bei ungestörter Synthese am ungeschädigten Matrizenstrang, blockiert. Der neu synthetisierte Tochterstrang wird als Matrize verwendet und so die Läsion umgangen (Wang 2001). Da die geschädigte Region als Matrize vermieden wird ist dieser Weg fehlerfrei. Genaue Details des Mechanismus in Eukaryoten sind allerdings noch nicht verstanden (Michel et al. 2001; McGlynn et al. 2002; Cox 2002; Ulrich 2007).

Der zweite mögliche Mechanismus benutzt direkt die geschädigte DNA als Matrize. Dabei sind zwei Schritte zu unterscheiden: 1.) Die Einfügung des Nukleotids gegenüber der Läsion (Transläsionssynthese) gefolgt von 2.) Der Ausdehnung der DNA Synthese (Wang 2001). Unselektive DNA-Polymerasen der Pol- γ Familie tolerieren dabei abnormal veränderte Strukturen der Matrizenstränge und können an DNA-Läsionen vorbei synthetisieren (Shcherbakova et al. 2006). Diese Polymerasen arbeiten mit reduzierter Genauigkeit an geschädigten und ungeschädigten Matrizensträngen. Die Transläsionssynthese ist dadurch fehleranfällig und die meisten Mutationen durch schädigende Agentien kommen nicht durch den Schaden selbst sondern durch die Aktivität der DNA-Polymerase zustande (Pages et al. 2002).

Die Transläsionssynthese kann wenn sie fehlerfrei ist die Mutagenese von Zellen vermeiden. Werden inkorrekte Nukleotide gegenüber der DNA-Läsion eingebracht kann sie ein Mutationen erzeugender Mechanismus sein (Wang 2001).

1.2.5 DNA-Schäden und Chromatinstruktur

Die Unterbringung der zwei Meter langen DNA in dem 10 μm großen Zellkern wird durch die Organisation der DNA in Chromatin ermöglicht.

Nukleosomen stellen die kleinste Untereinheit innerhalb der Chromatinstruktur dar. Sie bestehen aus einem 100 kDa großen Oktamer aus jeweils zwei Kopien vier verschiedener Histonproteinen um die sich die DNA in zwei superhelikalen lingsgängigen Schleifen von 147 Basenpaaren Länge wickelt. Die einzelnen Nukleosomen sind durch Verbindungs-DNA ("linker-DNA") variabler Länge (20-80 bp) miteinander verknüpft.

Das Ergebnis ist die Organisation der $6,4 \times 10^9$ bp einer menschlichen diploiden Zelle in über 30 Millionen Nukleosomen (Hansen 2002; Luger 2003; Kinner et al. 2008).

Zu den vier Histonen die das Histon Oktamer bilden zählen H2A, H2B, H3 und H4. Das Verbindungshiston gehört zur Histonfamilie H1 (Kornberg 1974; Luger et al. 1997; Richmond et al. 2003).

Diese niedrigste Stufe der Verpackung wird oft als Perlenkette beschrieben (Foster et al. 2005). Die weitere Chromatinverdichtung und nukleare Organisation (Cremer et al. 2001) wird durch weitere Proteine und die Interaktion der N-terminalen Enden der Kernhistone benachbarter Nukleosomen vermittelt und führt zur Bildung einer Faser von 30 nm Durchmesser. Weitere Verpackungsschritte führen zu der am dichtesten gepackten Konformation, dem Metaphasen Chromosom und sind noch wenig verstanden (Tremethick 2007; Kinner et al. 2008).

Die "Verpackung" der DNA in Chromatin erschwert sämtliche DNA-abhängige Prozesse wie die Transkription, Replikation, Rekombination und DNA-Reparatur. Daher haben Zellen Mechanismen entwickelt die die Chromatinstruktur verändern und den Zugriff auf die DNA regulieren können:

1.) ATP-abhängiges "*chromatin remodeling*", 2.) Einfügung von Histonvarianten in Nukleosomen und 3.) Kovalente Veränderung von Histonen (Altaf et al. 2007; Ismail et al. 2008). Zu den kovalenten Veränderungen zählen die Phosphorylierung, Acetylierung, Methylierung, Sumoylierung, Poly-(ADP-ribosyl-)ierung, Mono- und Polyubiqui-tylierung von Kernhistonen. Die Modifikationen können Ladungen der Histone verändern und die Fähigkeit zur effektiven Kondensation der DNA beeinflussen. Weiterhin können Chromatin-assoziierte Proteine neue Bindungen eingehen bzw. diese lösen (Peterson et al. 2004; Foster et al. 2005).

Ein Beispiel ist die Phosphorylierung des Histons H2AX in der Umgebung von DSB nach Einwirkung ionisierender Strahlung (Rogakou et al. 1998; Rogakou et al. 1999; Sedelnikova et al. 2002). Insgesamt existieren drei Varianten der H2A Familie in eukaryotischen Zellen: H2A1-H2A2, H2AX und H2AZ (West et al. 1980; Redon et al. 2002). H2AX (Mannironi et al. 1989) ist gleichmäßig im Chromatin verteilt und bildet 2-25 % des gesamten H2A Bestandes, abhängig von der Zelllinie und dem Gewebe in dem es betrachtet wird. Am C-terminalen Ende besitzt H2AX ein für die H2A Familie einzigartiges konserviertes Ser-Gln-Glu (SQE) Motiv. Diese Sequenz ist Angriffspunkt posttranslationaler Modifikationen. Als Antwort auf Schäden an der DNA wird H2AX an Serin 139 phosphoryliert (Rogakou et al. 1998; Rogakou et al. 1999; Ismail et al. 2008). Diese Modifikation ist eine der Wenigen, die am C-terminalen Ende der Histone stattfindet, da sich die meisten Histonveränderungen am Aminoende finden (Kinner et al. 2008). Vermittelt wird die Phosphorylierung durch die Phosphatidylinositol 3-kinase-ähnliche Familie der Proteinkinasen (PIKKs), die am SQE Motiv angreifen. Zu den drei Hauptvertretern dieser PIKKs zählen ATM (*ataxia teleangiectasia mutated*), ATR (*ATM and Rad3-related*) und DNA-PKcs (*DNA-dependent protein kinase*) wobei jede einzelne dieser Kinasen ihre Funktion auch bei genetischer Beeinträchtigung der Anderen ausführen kann. Viele Aspekte des Zusammenspiels dieser Kinasen und der Phosphorylierung von H2AX sind bis heute noch nicht geklärt. Jedoch kann angenommen werden, dass bei Schäden durch ionisierende Strahlung ATM die führende Kinase darstellt (Paull et al. 2000; Burma et al. 2001; Stiff et al. 2004).

Die phosphorylierte Form von H2AX wird, wie auch in der Literatur beschrieben, im Weiteren als γ -H2AX bezeichnet. In anderen Veröffentlichungen werden die Bezeichnungen H2AXS139ph oder phopho-H2AX verwendet (Rogakou et al. 2000; Ward et al. 2001; Foster et al. 2005).

γ -H2AX kann innerhalb weniger Minuten nach Einwirkung ionisierender Strahlung in Zellen nachgewiesen werden (Rothkamm et al. 2003a). Die Phosphorylierungen erreichen nach ca. 30 Minuten ein Maximum. Sie finden sich dabei nicht nur in enger Nachbarschaft zu DSB sondern breiten sich radial aus. In Säugerzellen werden pro DSB 0,03 % der H2AX-Moleküle phosphoryliert. Die Ausbreitung der Phosphorylierungen reicht bis zu einer Chromatinregion, die mehrere Megabasen vom DSB entfernt liegt und etwa 2000 γ -H2AX Moleküle einschließt wobei nicht jedes H2AX Molekül modifiziert wird (Rogakou et al. 1998; Rogakou et al. 1999; Pilch et al. 2003; Kinner et al. 2008).

Die Modifikationen des Chromatins haben dabei, im Vergleich zu den wenigen geschädigten Basenpaaren initial, die Funktion als „Signalverstärkung“. Sie dienen als Vorbereitungsplattform für sich anschließende Reparaturprozesse (Fernandez-Capetillo et al. 2002). Mit einem Phospho-spezifischen anti- γ -H2AX Antikörper lässt sich die massive Phosphorylierung von H2AX im Chromatin um den DSB als nukleärer Foci darstellen (Rogakou et al. 1999; Fernandez-Capetillo et al. 2003). Ein Foci entspricht dabei einem DSB (Sedelnikova et al. 2002).

Viele Komponenten der DNA-Schadensantwort wie ATM, BRCA1, 53BP1, MDC1, RAD51 und der MRE11/RAD50/NBS1 (MRN) Komplex bilden Foci aus (*ionizing radiation induced foci* = IRIF), die kolokalisiert von γ -H2AX-Foci zu finden sind.

Zwar sind die genauen Funktionen von H2AX noch nicht geklärt, Versuche an H2AX-*knock out* - Mäusen zeigen jedoch vermehrt chromosomale Instabilitäten, DNA-Reparaturfehler, Entwicklungsstörungen und männliche Infertilität. Diese Erkenntnisse weisen darauf hin, dass H2AX ein wichtiger Faktor während der DNA-Schadensantwort sein muss (Celeste et al. 2002).

Ein diskutierter Erklärungsansatz ist die Hypothese, dass γ -H2AX für die Rekrutierung von Reparatur- und Signalproteinen benötigt wird. Dafür spricht: a) die schnelle γ -H2AX IRIF Formation, die der Ansammlung der Reparaturproteine in IRIF vorausgeht; b) γ -H2AX wird für die Foci Bildung einiger Faktoren wie 53BP1, NBS1, BRCA1 and MDC1 benötigt; c) γ -H2AX interagiert direkt mit NBS1, 53BP1 and MDC1 (Fernandez-Capetillo et al. 2003; Fernandez-Capetillo et al. 2004).

Experimente zeigen, dass die initiale Rekrutierung von Reparaturfaktoren unabhängig von H2AX ist (Celeste et al. 2003). Die Retention und anschließende Anhäufung der Reparatur- und Signalproteine wird durch die direkte Interaktion zwischen H2AX und Proteinen ebenso wie durch die H2AX bedingte Veränderung des Chromatins vermittelt.

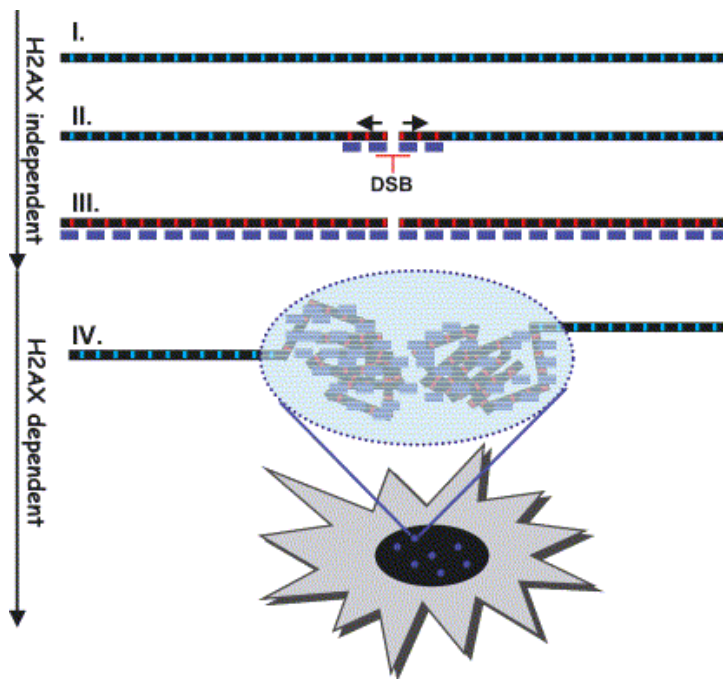


Abbildung 1-5: Modell der Rolle der H2AX-Phosphorylierung in der Chromatinkondensation nahe DNA-Doppelstrangbrüchen (Fernandez-Capetillo et al. 2004)

Weitere Funktionen sind die Fixierung der Bruchenden sowie das Lenken der Reparatur in Richtung von NHEJ und HR (Fernandez-Capetillo et al. 2004).

Um Stabilität und Integrität des Chromatins wiederherzustellen ist die Dephosphorylierung von γ -H2AX wichtig. Genaue Mechanismen sind noch nicht geklärt. Phosphatase 2A (PP2A) wurde als beteiligtes Enzym identifiziert. Möglich ist die direkte Dephosphorylierung vor Ort ebenso wie das Ersetzen von γ -H2AX mit H2AX, wobei ersteres in höheren Eukaryoten als dominierender Mechanismus angenommen wird (Kinner et al. 2008). Die Abnahme der γ -H2AX-Foci im Zellkern zeigt die Reparatur der Strangbrüche über die Zeit.

γ -H2AX gilt heute als konsistenter und quantitativer Marker von DSB insbesondere beim Vorhandensein einer geringen Anzahl an DSB (Rothkamm et al. 2003a).

1.2.6 Methoden zur Quantifizierung von DNA-Doppelstrangbrüchen

Es gibt eine Reihe von Untersuchungen die Schäden an der DNA nachweisen können. Zu den Methoden der Quantifizierung von DNA-DSB gehören die Pulsgelelektrophorese (Whitaker et al. 1991), der Comet Assay (Fairbairn et al. 1995; Collins 2004) und die TUNEL Methode (Hewitson et al. 2006).

Diesen "klassischen" Methoden gemeinsam ist, dass die Grenze ab der die DSB sicher vom Hintergrund abgegrenzt werden können in einem vergleichsweise hohen Dosisbereich liegt, in welchem bereits um die 100 DSB pro Zellkern existieren. Der Comet Assay ist zwar sensitiver gegenüber den übrigen Untersuchungen, benötigt aber trotzdem Strahlendosen um 1 Gy (Lobrich et al. 2006), was höher ist als die Dosen, die den meisten normalen Geweben während der Radiotherapie zugeführt werden. Pro Gray werden bereits ca. 30-40 DSB in der Zelle erzeugt (Ward 1988). Die genaue Lokalisation des DSB im Zellkern ist mit diesen Untersuchungen nicht möglich (Takahashi et al. 2005).

Durch die Studien von Rothkamm und Löbrich wurde eine neue Methode mit höherer Sensitivität etabliert. DSB können mittels Immunfluoreszenz in einem Dosisbereich unter 1 mGy quantifiziert werden. Durch Verwendung eines fluoreszierenden Antikörpers gegen γ -H2AX können die Foci in der unmittelbaren Umgebung der DSB sichtbar gemacht werden. Es konnte gezeigt werden, dass 1 Foci einem DSB entspricht und die Anzahl der Foci linear mit dem DLP ansteigt (Rothkamm et al. 2003a; Lobrich et al. 2006). Die Kinetik von Formation und Verschwinden der γ -H2AX Foci deckt sich mit der Induktion bzw. der Reparatur von DSB (Foster et al. 2005; Ismail et al. 2008). Aufgrund der hohen Sensitivität, der genauen Lokalisation der DSB und der Schnelligkeit des Versuches, hat sich beim Nachweis von DSB die Immunfluoreszenzfärbung als Goldstandard etabliert und wird auch im Rahmen dieser Arbeit als Methode verwendet (Fernandez-Capetillo et al. 2004).

2. Zielsetzung

Jeder Mensch ist in seinem Leben einer gewissen Strahlendosis ausgesetzt. Zu den Quellen natürlicher Strahlung zählen kosmische Strahlung aus dem Weltraum und der Sonne, radioaktive Substanzen aus der Erde und innerhalb des menschlichen Körpers. Berufliche Strahlenexpositionen, Flugreisen, Exkursionen im Weltraum und *“radiologischer“* Terrorismus betreffen einen weiteren Teil der Gesellschaft. Die jährliche effektive Dosis pro Kopf beträgt 2,4 mSv.

Neben diesen zum Teil unvermeidlichen Strahlenexpositionen bilden diagnostische Verfahren in der Medizin mit einem Anteil von ungefähr 14 % den größten vom Menschen verursachten Anteil an ionisierender Strahlung weltweit. Die effektive Dosis beträgt durchschnittlich 0,4 mSv pro Jahr (UNSCEAR 2000; Gilbert 2001; Lobrich et al. 2005).

Zu den bedeutendsten diagnostischen und therapeutischen Verfahren zählen die Computertomographie (CT) und Angiographie (Fuchs et al. 2001). Die Computertomographie trägt den größten Teil zur jährlichen Gesamtdosis bei.

Die effektive Dosis des Patienten im Rahmen einer konventionellen Röntgenaufnahme des Thorax beträgt ungefähr 0,02 mSv. Die effektive Dosis einer Computertomographie des Thorax bewegt sich in der Größenordnung um 5-7 mSv (Haaga 2001; Nickoloff et al. 2001; Martin 2008).

Ionisierende Strahlung kann durch Schäden an der DNA zu Leukämie und anderen Krebserkrankungen führen. DNA-Doppelstrangbrüche gehören dabei zu den bedeutendsten Schäden, die die Karzinogenese initiieren können (Dianov et al. 2001; Burma et al. 2004). Eine Studie von Amy Berrington de González und Sarah Darby zeigt das Risiko für das Auftreten einer Krebserkrankung durch die Verwendung von Röntgenstrahlung in 14 verschiedenen Ländern. In Deutschland wird Röntgenstrahlung für 1,5 % des kumulativen Krebsrisikos der Patienten bis zu einem Alter von 75 Jahren verantwortlich gemacht, was 2.049 Fällen pro Jahr entsprechen würde (Berrington de Gonzalez et al. 2004; Herzog et al. 2004).

Solche Schätzungen des Krebsrisikos basieren vor allem auf epidemiologischen Studien

von Bevölkerungsgruppen, die besonders intensiver Strahlung ausgesetzt waren beispielsweise Überlebende des Atombombenabwurfes von Hiroshima und Nagasaki (Mountford et al. 1992; Charles 2001). Die niedrigsten Strahlendosen, für die dabei nachweislich von einem erhöhten Krebsrisiko ausgegangen werden kann, liegen zwischen 10 und 50 mGy (Brenner et al. 2003). Risikoschätzungen auf Höhe von diesem Level und darunter basieren auf linearen Explorationen existierender Hochdosisdaten. (Berrington de Gonzalez et al. 2004; Brenner et al. 2004; Brenner 2004). Die Validität der extrahierten Daten wird dabei durch radiobiologische Phänomene wie den Bystander effect, Hypersensitivität gegenüber niedrigen Strahlendosen, verzögerte genomische Instabilität und induzierte DNA-Reparatur anfechtbar (Lobrich et al. 2005). Versuche zeigen, dass DSB, die durch sehr geringe Strahlendosen (1 mGy) in Fibroblasten erzeugt wurden, im Gegensatz zu denen höherer Dosen noch über Tage nachweisbar waren (Rothkamm et al. 2003a). Um genaue Aussagen über DNA-Schäden und Reparatur in niedrigen Dosisbereichen machen zu können ist es deshalb notwendig eine Methode zu etablieren, die direkt die Auswirkung ionisierender Strahlen auf die DNA messen kann. Durch die Quantifizierung von γ -H2AX-Foci mittels Immunfluoreszenzfärbung konnte die Nachweisgrenze von DNA-Doppelstrangbrüchen nach Einwirken ionisierender Strahlung von einigen Gray auf einige mGray gesenkt werden. In Studien wurde gezeigt, dass dieses Verfahren in vivo bei Lymphozyten anwendbar ist und der Verlust von γ -H2AX-Foci mit der Reparatur der DSB korreliert (Rothkamm et al. 2003a; Lobrich et al. 2005; Rothkamm et al. 2007; Geisel et al. 2008).

Darüber hinaus benötigen viele bildgebenden Verfahren den Einsatz jodhaltiger Kontrastmittel. Über die Nieren- und zytotoxischen Effekte von Kontrastmittel ist viel bekannt (Norman et al. 1978; Thomsen et al. 2003; Haller et al. 2004; Joubert et al. 2005; Toprak 2007; Solomon 2007). Allerdings gibt es kaum Kenntnisse über die möglicherweise dosismodifizierende Wirkung dieser Substanzen (Grudzenski et al. 2009). Dennoch gibt es Annahmen darüber, dass durch die Verwendung von jodhaltigen Kontrastmittel die Menge der Strahlenschäden an der DNA erhöht wird (Norman et al. 2001).

Die Frage nach dem Einfluss auf die Induktion und Reparatur dieser Schäden ist ein wichtiger Ansatz für zukünftige Forschungen und soll im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden.

Die Inhibition von Säugerzellen durch ionisierende Strahlung kann durch Erwärmung erheblich gesteigert werden. Dieser Effekt wird als Thermosensibilisierung bezeichnet und wird für die Behandlung von Krebserkrankungen ausgenutzt. In der klinischen Anwendung werden hyperthermische Temperaturen zwischen 40 und 46 °C verwendet (Dietzel 1983). Das Ausmaß dieses Effektes nimmt mit der Höhe der Temperatur und der Dauer der Erwärmung zu (Dikomey et al. 1991). Generell ist er abhängig vom Intervall zwischen Bestrahlung und Erwärmung (Raaphorst et al. 1999) sowie von der Zellzyklusphase (Kim et al. 1976). Viele Arbeiten zeigen, dass Wärmeeinwirkung allein nur geringe DNA-Schäden induziert oder erhöht, dafür aber deren Reparatur beeinflusst (Dikomey 1982; Vilenchik 1989). Dies wurde für alle Arten von Schäden gefunden u.a. auch für DNA-Doppelstrangbrüchen (Corry et al. 1977; Bowden et al. 1981; Kampinga et al. 1997). In jüngster Zeit wurden durch Hitze induzierte γ -H2AX-Foci beschrieben (Takahashi et al. 2004; Takahashi et al. 2010). Es wird angenommen, dass durch Hitze einwirkung Doppelstrangbrüche durch die Bildung von Radikalen in vivo (Hall et al. 1994; Bruskov et al. 2002) und durch Denaturierung hitzelabiler Reparatorenzyme induziert werden (Takahashi et al. 2008). Andere Arbeiten zeigen keinen Zusammenhang zwischen Wärmeeinwirkung und der Induktion von DSB (Kampinga et al. 2005; Wu et al. 2009). Obige Erkenntnisse, die eine wichtige Rolle in der Strahlentherapie spielen, führen zu der Frage ob auch im Bereich der radiologischen Diagnostik, durch Modifikation der Temperatur während der Bestrahlung, die Induktion und anschließende Reparatur von DSB beeinflusst werden kann.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte

1. die Immunfluoreszenzfärbung für γ -H2AX im Labor etabliert werden,
2. die Menge der DNA-Doppelstrangbrüche in Lymphozyten bei verschiedenen Strahlendosen quantifiziert werden,
3. eine Kinetik der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen nach Bestrahlung in vitro aufgestellt werden,
4. ein Vergleich der Anzahl an DNA-Doppelstrangbrüchen zwischen den Versuchen mit Kontrastmittel und den Versuchen ohne Kontrastmittel sowie
5. ein Vergleich der Menge an DNA-Doppelstrangbrüchen und deren Reparatur bei unterschiedlichen Temperaturen aufgestellt werden.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Gerät	Typ	Hersteller, Ort
Brutschrank	Function Line	Heraeus, Hanau, Deutschland
Dosimeter	Diados 11003-0178	PTW, Freiburg, Deutschland
Feinwaage	Kern 770	Kern, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop mit CCD-Kamera	Axiovert 200 M inverted fluorescence microscope	Carl Zeiss Jena, Deutschland
Imaging Software	Wasabi	Hamamatsu, Hamamatsu City, Japan
Mikroskop	LH50A	Olympus
Pipeteur	Pipetusakku	Hirschmann
Pipetten	Pipetman P2, P20, P200, P1000	Gilson, Middleton, USA
Röntgengerät		Multix M, Siemens Medical Solutions, Erlangen, Deutschland
Schüttlerwasserbad	GTL 1083	GFL, Deutschland
Software	Axiovision	Carl Zeiss Jena, Deutschland

Sterile Werkbank	Modell ET 130V/UV	Ehret, Emmerdingen, Deutschland
Sterile Werkbank	Sicherheitswerkbank HeraSafe	Heraeus, Hanau, Deutschland
Waage	Kern EMP 220-1	Kern & Sohn GmbH, Deutschland
Wasserbad	Thermomix BU	Braun, Melsungen, Deutschland
Wasserentionisierungsanlage	Milli Q UF plus	Millipore, Belgrad
Wippe	Eigenbau der Universitätswerkstatt	Werkstatt der medizinischen Forschungseinheiten, Marburg, Deutschland
Zählkammer	Neubauer Improved Bright-Line	Mariefeld, Deutschland
Zentrifuge	Megafuge 1.0	Heraeus, Hanau, Deutschland

3.1.2 Chemikalien

Chemikalie	Typ	Hersteller, Ort
Lymphozyten- Trennmedium	LSM 1077	PAA, Cölbe, Deutschland
Methanol	100% Methanol, technisch	ACROS Organics, New Jersey, USA
Mounting Medium	Fluorescent Mountin Medium	Dako, Hamburg, Deutschland
Triton	TritonX 100	Roth, Karlsruhe, Deutschland

3.1.3 Medien und Waschlösungen

PBS: 137 mM NaCl 2,7 mM KCL 6,5 mM Na ₂ HPO ₄		Roth, Karlsruhe, Deutschland
Serum	FBS (Fetal Bovine Serum)	PAA, Cölbe, Deutschland

3.1.4 Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe

Antikörper/Farbstoff	Typ	Hersteller, Ort
Primärer Antikörper	Anti-phospho-Histone H2A.X (Ser139), clone JBW301	Millipore, Schwalbach/Ts., Deutschland
Sekundärer Antikörper	PF-488 Goat anti-Mouse IgG conjugate	Promokine, Promocell, Heidelberg, Deutschland
Zellkernfarbstoff DAPI	4,6-Diamidino-2- phenylindole Dihydrochloride	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland

3.1.5 Blutentnahme

Material	Typ	Hersteller, Ort
Monovetten	S-Monovette 5,5 ml AH	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Venenpunktionsbesteck	Multifly Set	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

3.1.6 Sonstige Materialien

Material	Typ	Hersteller
Deckgläser	24 x 24 mm	Menzel, Braunschweig, Deutschland
Einmalpipetten	Einmalpipette 1 ml, steril	Falcon, Heidelberg
Eppendorfgefäß	Safe-Lock-2ml	Eppendorf, Hamburg
Falcon-Röhrchen	Cellstar, PP-Test Tubes, 50ml	Greiner-Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Falcon-Röhrchen	Cellstar, PP-Test Tubes, 15ml	Greiner-Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Kontrastmittel	Ultravist 370	Bayer Vital, Leverkusen, Deutschland
Leucosep-Röhrchen	Leucosep®	Greiner-Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Objektträger	SuperFrost plus	Menzel, Braunschweig, Deutschland

3.2 Methoden

3.2.1 Blutentnahme

Alle Blutentnahmen erfolgten von derselben 37-jährigen männlichen Testperson, um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse durch mögliche Variationen in Lymphozytenmerkmalen nicht zu beeinflussen.

Alle Entnahmen wurde aus einer oberflächlichen Vene der oberen Extremität mittels eines Venofix Venenpunktionsbestecks vorgenommen. Für jeden der geplanten Zeitschritte sowie die Negativkontrolle wurden jeweils ca. 5 ml Blut entnommen. Die Blutentnahme erfolgte in Monovetten mit Lithium-Heparin-Gel.

3.2.2 Isolation der Lymphozyten

Alle Proben wurden unmittelbar nach Blutentnahme weiterbearbeitet. 5 ml Blut wurde in einem 50 ml Falcon-Röhrchen mit 10 ml PBS verdünnt. Nach Befüllen der Leucosep-Röhrchen mit 15 ml Lymphozytentrennmedium und Zentrifugation für 30 sec bei 1000 x g wurde das Blut-PBS-Gemisch auf das Leucosep - Röhrchen pipettiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 1.200 x g für 20 min bei ausgeschalteter Bremse (Tripodi et al. 1971). Anschließend wurden die Lymphozyten der Interphase abpipettiert und in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt. Es folgten zwei Waschgänge mit PBS bei 250 x g für 10 min bei eingeschalteter Bremse. Der Überstand wurde abpipettiert und das Pellet zunächst mit 10 ml, nach dem zweiten Waschgang mit 3 ml PBS resuspendiert.

Danach wurden die Proben bestrahlt.

3.2.3 Bestrahlung

Die isolierten Lymphozyten wurden mit 102 kVp - Röntgenstrahlung und der jeweiligen Dosis von 20 mGy, 100 mGy, 200 mGy und 1000 mGy bestrahlt. Die Kontrollprobe wurde nicht bestrahlt.

Die jeweiligen Strahlendosen wurden mit einem DIADOS Dosimeter überprüft.

3.2.4 Fixierung der Lymphozyten

Im direkten Anschluss an die Bestrahlung der einzelnen Proben folgte ein 3. Waschgang mit PBS bei 250 x g für jeweils 10 min bei eingeschalteter Bremse.

Für die Auszählung der Lymphozyten wurde vor der letzten Waschung 10 µl entnommen und die Zellen unter dem Mikroskop mit der Zählkammer ausgezählt. Daraus berechnete sich die Gesamtzellzahl (Gezählte Zellen x 10 000 x 3) und die Menge an PBS um in 5 µl eine Zellzahl von 50 000 zu erreichen.

$$x \mu\text{l} / \text{Gesamtzellzahl} = 5 \mu\text{l} / 50\,000 \text{ Zellen}$$

$$x \mu\text{l} = 5 \mu\text{l} / 50\,000 \text{ Zellen} \times \text{Gesamtzellzahl}$$

Anschließend wurde das Pellet mit der ausgerechneten Menge PBS resuspendiert. Zur Darstellung der Reparatureffekte über die Zeit wurden die Proben sofort, 30 min, 1 h und 24 h nach Bestrahlung fixiert. Dafür wurde ein ca. 5 µl Tropfen in die Mitte eines Objektträgers aufgetragen und für 10 min luftgetrocknet. Anschließend erfolgte die Fixation der Lymphozyten für 30 min in 100 % Methanol bei - 20 °C.

Alle Arbeiten fanden unter einer sterilen Werkbank statt.

3.2.5 Immunfluoreszenzfärbung

Zunächst wurden die Zellen bei Raumtemperatur für 30 min in PBS mit 0,5 % Triton X 100 gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 0,5 % Triton X 100 PBS für 30 Minuten permeabilisiert und in 0,5 % Triton X 100 PBS mit 10 % Fetal Bovine Serum (FBS) über Nacht bei 4 °C geblockt.

Am nächsten Morgen wurden die Zellen mit 40 µl des primären Antikörpers in einer 1 : 200 Verdünnung in 0,5 % Triton X 100 PBS für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 3 x 10 min in PBS mit 1 % FBS und 0,5 % Triton X 100 gewaschen. Dann wurde mit 40 µl des 1 : 200 verdünnten sekundären Antikörpers für 1 h bei Dunkelheit inkubiert und anschließend die Zellen 3 x 10 min in PBS mit 1 % FBS und 0,5 % Triton X 100 gewaschen. Zur Zellkernfärbung wurde 40 µl 1 : 2.000 in PBS verdünntes 4,6-Diamidino-2-phenylindol für 5 min auf die Zellen gegeben. Es folgten 2 Waschgänge für 5 min mit PBS. Die Zellen wurden nun mit Fluorescent Mounting Medium auf SuperFrost plus - Objektträgern eingedeckelt und mindestens 4 h im Kühlschrank getrocknet (Rothkamm et al. 2003; Widel et al. 2003).

3.2.6 Mikroskopische Auswertung

Die Auswertung erfolgte mit einem *Axiovert 200 M inverted Fluoreszenzmikroskop* mit CCD-Kamera. Für die quantitative Analyse wurden die Foci bei 630-facher Vergrößerung ausgezählt. Granulozyten und Monozyten wurden anhand morphologischer Kriterien identifiziert und nicht in die Auswertung mit einbezogen.

Für jeden Zeitschritt wurden zwei Bereiche auf zwei separaten Deckgläsern mit jeweils mindestens 40 Zellen und 40 Foci ausgewertet (Rothkamm et al. 2003; Widel et al. 2003).

3.2.7 Statistische Analyse

Für die statistische Auswertung wurden die Mittelwerte aus den einzelnen Messungen der 6 Versuche für jede Dosisgruppe berechnet.

Statistische Unterschiede zwischen den Proben mit und ohne Kontrastmittelgabe sowie den Proben unterschiedlicher Temperaturen, wurden mit Hilfe eines T-Testes gemessen. Die Unterschiede wurden als statistisch signifikant gemessen wenn der p-Wert kleiner als 0,05 betrug. Für alle statistischen Berechnungen wurde Microsoft Excel (2000) verwendet.

3.3 Versuchsaufbau

Um den Einfluss verschiedener Faktoren auf die Entstehung und den Verlauf der γ -H2AX bei Strahleneinwirkung zu untersuchen, wurden die einzelnen Experimente je nach Fragestellungen entsprechend modifiziert.

Daraus ergaben sich 6 unterschiedliche Versuchsaufbaue. Jeder Versuch wurde 4 mal wiederholt, um Fehler durch mögliche Ausreißer gering zu halten.

3.3.1 Zeitplan und Bestrahlungsdosen der Untersuchungen

Um Aussagen über die Korrelation von Strahlendosis und der Induktion der γ -H2AX treffen zu können wurden die Lymphozyten pro Versuchsreihe mit 20 mGy, 100 mGy, 200 mGy und 1000 mGy bestrahlt. Zusätzlich wurde eine Kontrolle unbestrahlt belassen.

Um das Reparaturverhalten der DSB über die Zeit zu prüfen wurden die Lymphozyten nach Bestrahlung in festgelegten Zeitabschnitten fixiert:

- sofort nach Bestrahlung
- 30 min nach Bestrahlung
- 1 h nach Bestrahlung
- 2 h nach Bestrahlung
- 24 h nach Bestrahlung

3.3.2 Variation der Umgebungstemperatur

Ein weiterer Ansatz dieser Arbeit soll zeigen ob die Variation der Umgebungstemperatur Einfluss auf die Entstehung und auf das Reparaturverhalten der γ -H2AX hat. Dies wurde an 3 unterschiedlichen Temperaturen geprüft:

Zunächst wurde der Versuch mit beschriebener Methode bei Raumtemperatur durchgeführt.

Der 2. Versuchsaufbau fand bei 4 °C statt. Dabei wurden die Lymphozyten bis zur Fixation auf Eis gelegt .

Beim 3. Versuchsaufbau wurden die Lymphozyten im 37 ° C warmen Wasserbad bis zur Fixierung gelagert. Für die 24 h Kontrolle fand die Aufbewahrung im Brutschrank statt.

3.3.3 Kontrastmittel

Zur Klärung eines möglichen Einflusses von jodiertem Kontrastmittel auf die Formation und Kinetik der DSB, wurden alle Versuche mit und ohne Kontrastmittel durchgeführt.

Den Proben wurde zur Simulation der Konzentration an Kontrastmittel während CT-Untersuchungen vor der Bestrahlung 10 % Kontrastmittel beigefügt.

4. Ergebnisse

4.1 Formation und Kinetik der γ -H2AX-Foci

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zur Quantifizierung von DNA-Doppelstrangbrüchen die Darstellung der γ -H2AX-Foci durch Immunfluoreszenz gewählt.

Dabei wurden bei verschiedenen Strahlendosen und unterschiedlichem Versuchsaufbau die Zahl der induzierten γ -H2AX-Foci direkt, 30 min, 1 h, 2 h und 24 h nach Bestrahlung ausgezählt.

4.1.1 γ -H2AX-Foci nach in vitro Bestrahlung von humanen Lymphozyten bei 4 °C mit Kontrastmittelgabe

Bei einer Versuchstemperatur von 4 °C wurden die γ -H2AX-Foci nach Bestrahlung mit unterschiedlichen Strahlendosen zu den 5 verschiedenen Zeitpunkten ausgezählt.

Die Focizahl zeigte dabei einen linearen Anstieg mit Erhöhung der Dosis und senkte sich in allen Proben bis zur letzten Auszählung nach 24 h ab.

In der Kinetik der γ -H2AX-Foci fanden sich leichte Unterschiede zwischen den einzelnen Strahlendosen: Nach Bestrahlung mit 20 mGy und 100 mGy zeigte sich ein anfänglicher Dosisanstieg bis 1 h nach Bestrahlung um dann konstant abzufallen. Höhere Strahlendosen zeigten diesen Abfall sofort im Anschluss an den initialen Dosisanstieg.

Für alle Strahlendosen fanden sich nach 24 h im Vergleich zur Negativkontrolle noch immer erhöhte Werte (s. Tabelle und Abbildung 4-1).

Tabelle 4-1: Tabellarische Ergebnisübersicht nach Bestrahlung: 4 °C mit Kontrastmittel

	20 mGy	100 mGy	200 mGy	1000 mGy
T1	0,72	2,05	4,37	9,31
T2	0,95	2,63	4,06	7,14
T3	1,04	3,43	4,58	6,59
T4	0,95	2,15	3,16	5,32
T5	0,86	1,85	2,14	3,50

Negativkontrolle: 0,28

Jeder Messwert ist der Mittelwert der vier unabhängigen Zählungen mit jeweils mindestens 40 Zellen und 40 Foci.

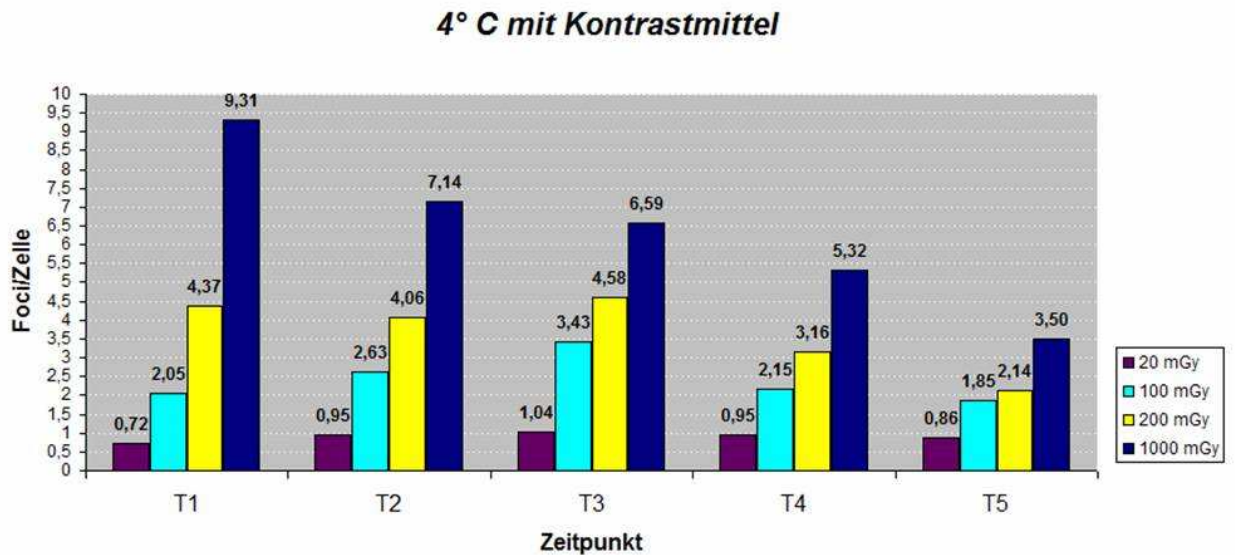


Abbildung 4-1: Kinetik der γ-H2AX-Foci pro Zelle nach applizierter Röntgenstrahlung in humanen Lymphozyten bei 4 °C und Kontrastmittelgabe. Jeder Balken ist der Mittelwert aus vier unabhängigen Zählungen mit jeweils mindestens 40 Zellen und 40 Foci.

4.1.2 γ -H2AX-Foci nach in vitro Bestrahlung von humanen Lymphozyten bei 4 °C ohne Kontrastmittelgabe

Für die Bestrahlung der Lymphozyten bei 4 °C ohne Kontrastmittelgabe zeigten die Ergebnisse einen linearen Anstieg der Focizahl bei allen Strahlendosen sowie einen anschließenden Abfall bis zur letzten Auszählung nach 24 h.

Es ergab sich ein Anstieg der ausgezählten γ -H2AX-Foci bis 30 min nach Bestrahlung und anschließend kontinuierlichem Abfall bei Strahlendosen bis einschließlich 200 mGy. Bei Bestrahlung mit 1000 mGy fand sich dieser Abfall direkt im Anschluss an den initialen Anstieg.

Zum Zeitpunkt T5 war die Anzahl der Foci bei allen Strahlendosen im Vergleich zur Negativkontrolle noch immer höher (s. Tabelle und Abbildung 4-2).

Tabelle 4-2: Tabellarische Ergebnisübersicht nach Bestrahlung: 4 °C ohne Kontrastmittel

	20 mGy	100 mGy	200 mGy	1000 mGy
T1	0,75	1,71	2,59	6,67
T2	0,95	2,12	2,81	6,30
T3	0,84	1,43	2,46	5,08
T4	0,71	1,65	2,29	4,35
T5	0,62	1,52	2,08	4,19

Negativkontrolle: 0,35

Jeder Messwert ist der Mittelwert der vier unabhängigen Zählungen mit jeweils mindestens 40 Zellen und 40 Foci.

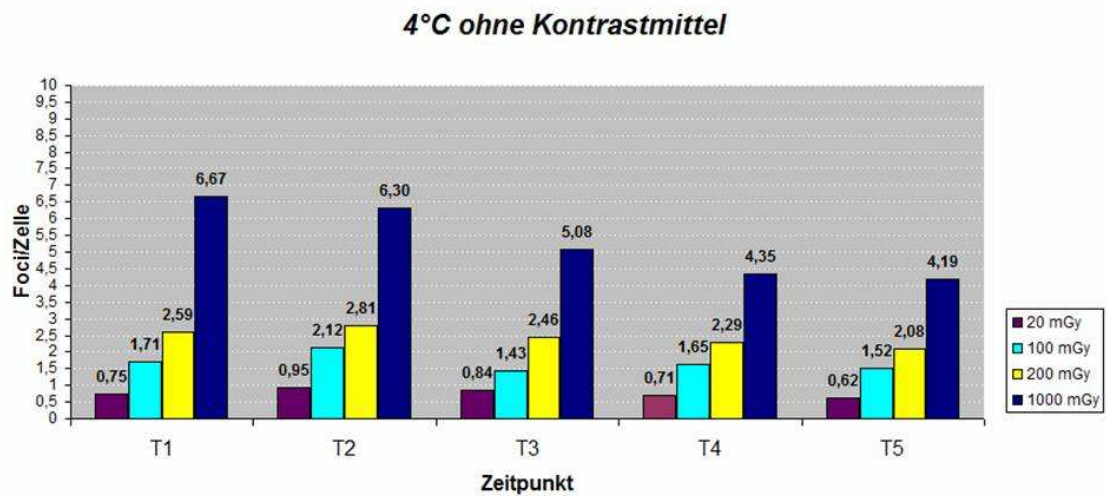


Abbildung 4-2: Kinetik der γ -H2AX-Foci pro Zelle nach applizierter Röntgenstrahlung in humanen Lymphozyten bei 4 °C ohne Kontrastmittelgabe. Jeder Balken ist der Mittelwert aus vier unabhängigen Zählungen mit jeweils mindestens 40 Zellen und 40 Foci.

4.1.3 γ -H2AX-Foci nach in vitro Bestrahlung von humanen Lymphozyten bei Raumtemperatur mit Kontrastmittelgabe

Nach Bestrahlung der Lymphozyten bei Raumtemperatur und der Gabe von Kontrastmittel zeigte sich mit steigender Strahlendosis ein linearer Anstieg der Focizahl.

Nach initialem Anstieg bis 30 min nach Bestrahlung für Dosen bis einschließlich 200 mGy, zeigten die Focizahlen einen kontinuierlichen Abfall. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei 1000 mGy nach initialem Anstieg bereits zur Messung nach 30 min ein kontinuierlicher Abfall der Focizahl.

Nur für die Bestrahlung mit 20 mGy wurden dabei nach 24 h annähernd mit der Negativkontrolle vergleichbare Werte erreicht. Für alle anderen Strahlendosen wurden noch immer erhöhte Focilevel ausgezählt (s. Tabelle und Abbildung 4-3).

Tabelle 4-3: Tabellarische Ergebnisübersicht nach Bestrahlung: Raumtemperatur mit Kontrastmittel

	20 mGy	100 mGy	200 mGy	1000 mGy
T1	0,93	2,64	4,08	8,39
T2	1,00	2,59	4,97	7,96
T3	0,88	1,90	4,28	6,82
T4	0,77	1,64	4,08	5,91
T5	0,40	0,88	1,06	1,41

Negativkontrolle: 0,17

Jeder Messwert ist der Mittelwert der vier unabhängigen Zählungen mit jeweils mindestens 40 Zellen und 40 Foci.

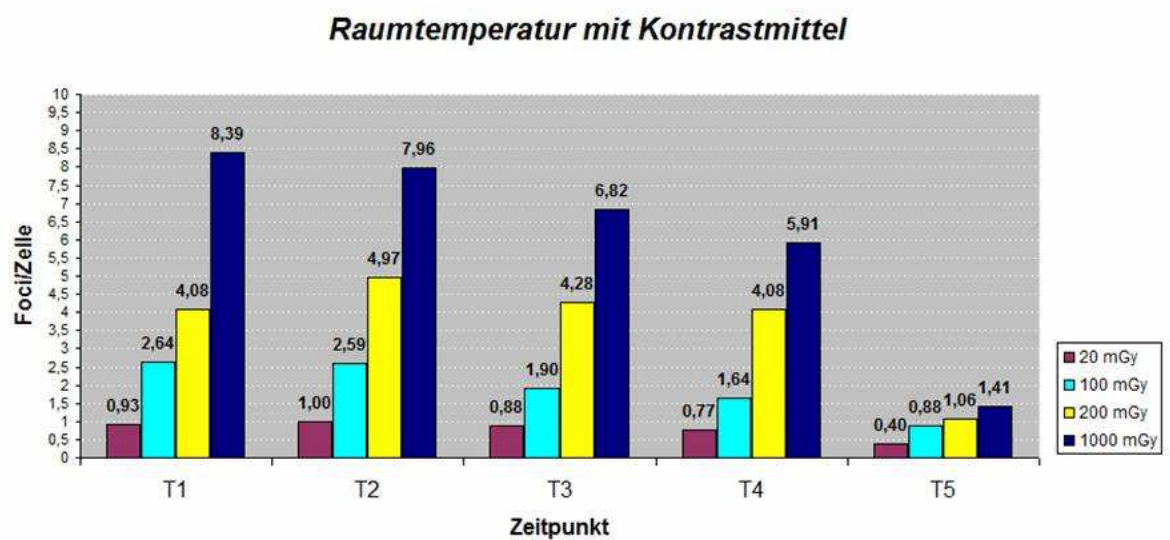


Abbildung 4-3: Kinetik der γ -H2AX-Foci pro Zelle nach applizierter Röntgenstrahlung in humanen Lymphozyten bei Raumtemperatur und Kontrastmittelgabe. Jeder Balken ist der Mittelwert aus vier unabhängigen Zählungen mit jeweils mindestens 40 Zellen und 40 Foci.

4.1.4 γ -H2AX-Foci nach in vitro Bestrahlung von humanen Lymphozyten bei Raumtemperatur ohne Kontrastmittelgabe

Bei Bestrahlung der Lymphozyten bei Raumtemperatur ohne Kontrastmittelgabe zeigten die induzierten γ -H2AX-Foci pro Zelle einen linearen Anstieg mit Erhöhung der Bestrahlungsdosis.

Bei niedrigen Dosen bis einschließlich 200 mGy zeigte sich ein Anstieg bis 30 min nach Bestrahlung und anschließender Rückgang der Foci auf Level, die bei 20 mGy nach 24 h nahe der Negativkontrolle lagen, bei den höheren Strahlendosen zu diesem Zeitpunkt jedoch noch immer erhöht waren.

Bei der Strahlendosis von 1000 mGy zeigten die Auszählungen nach initialem Focianstieg einen kontinuierlichen Rückgang der Focizahl, die nach 24 h im Vergleich zur Negativkontrolle noch immer erhöht war (s. Tabelle und Abbildung 4-4).

Tabelle 4-4: Tabellarische Ergebnisübersicht nach Bestrahlung: Raumtemperatur ohne Kontrastmittel

	20 mGy	100 mGy	200 mGy	1000 mGy
T1	0,80	1,77	2,94	7,04
T2	1,07	2,20	3,62	7,23
T3	0,73	2,05	3,56	6,60
T4	0,66	1,96	3,19	5,06
T5	0,33	0,69	0,79	1,88

Negativkontrolle: 0,20

Jeder Messwert ist der Mittelwert der vier unabhängigen Zählungen mit jeweils mindestens 40 Zellen und 40 Foci.

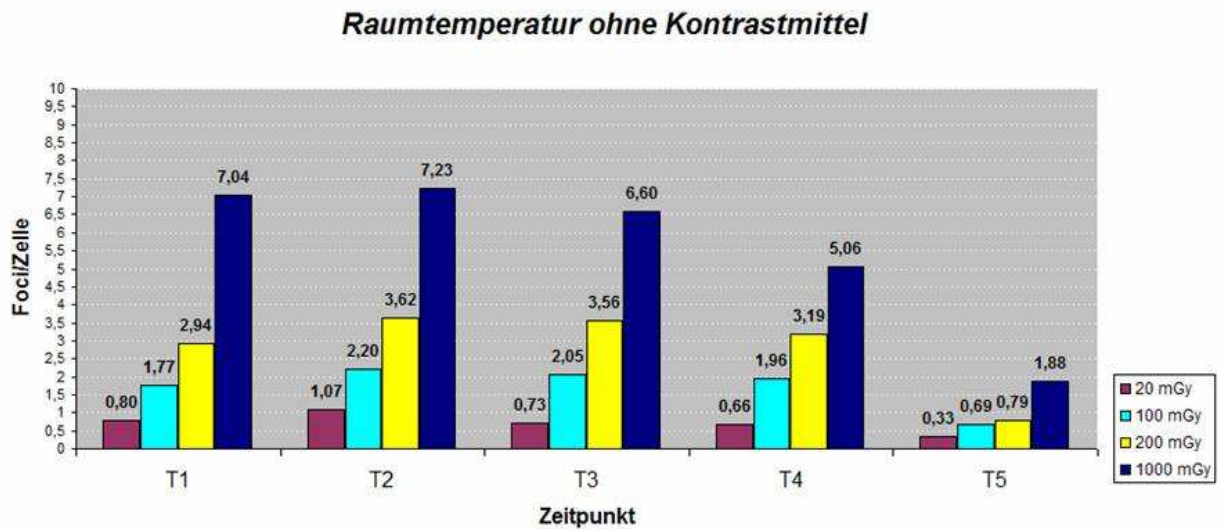


Abbildung 4-4: Kinetik der γ -H2AX-Foci pro Zelle nach applizierter Röntgenstrahlung in humanen Lymphozyten bei Raumtemperatur ohne Kontrastmittelgabe. Jeder Balken ist der Mittelwert aus vier unabhängigen Zählungen mit jeweils mindestens 40 Zellen und 40 Foci.

4.1.5 γ -H2AX-Foci nach in vitro Bestrahlung von humanen Lymphozyten bei 37 °C mit Kontrastmittelgabe

Die Versuchsreihe bei 37 °C mit Kontrastmittel zeigte einen linearen Anstieg der induzierten Foci mit Erhöhung der Strahlendosis und einen Rückgang bis 24 h nach Bestrahlung.

Während die Strahlendosen bis einschließlich 200 mGy einen Anstieg der Focizahl bis 30 min nach Bestrahlung zeigten, um danach kontinuierlich abzusinken, fand sich bei 1000 mGy sofort nach initialem Anstieg ein Rückgang der Foci.

Nach 24 h waren die Foci bei der Bestrahlung mit 1000 mGy im Vergleich zur Negativkontrolle noch immer erhöht, während die Focizahlen bei den niedrigen Bestrahlungsdosen zu diesem Zeitpunkt wieder nahe der Negativkontrolle lagen und nur noch minimale Unterschiede zwischen den einzelnen Dosen aufzeigten (s. Tabelle und Abbildung 4-5).

Tabelle 4-5: Tabellarische Ergebnisübersicht nach Bestrahlung: 37 °C mit Kontrastmittel

	20 mGy	100 mGy	200 mGy	1000 mGy
T1	1,29	2,91	4,18	8,51
T2	1,35	3,18	5,08	8,34
T3	0,90	2,50	3,54	6,01
T4	0,89	2,15	2,87	4,91
T5	0,31	0,36	0,36	1,79

Negativkontrolle: 0,20

Jeder Messwert ist der Mittelwert der vier unabhängigen Zählungen mit jeweils mindestens 40 Zellen und 40 Foci.

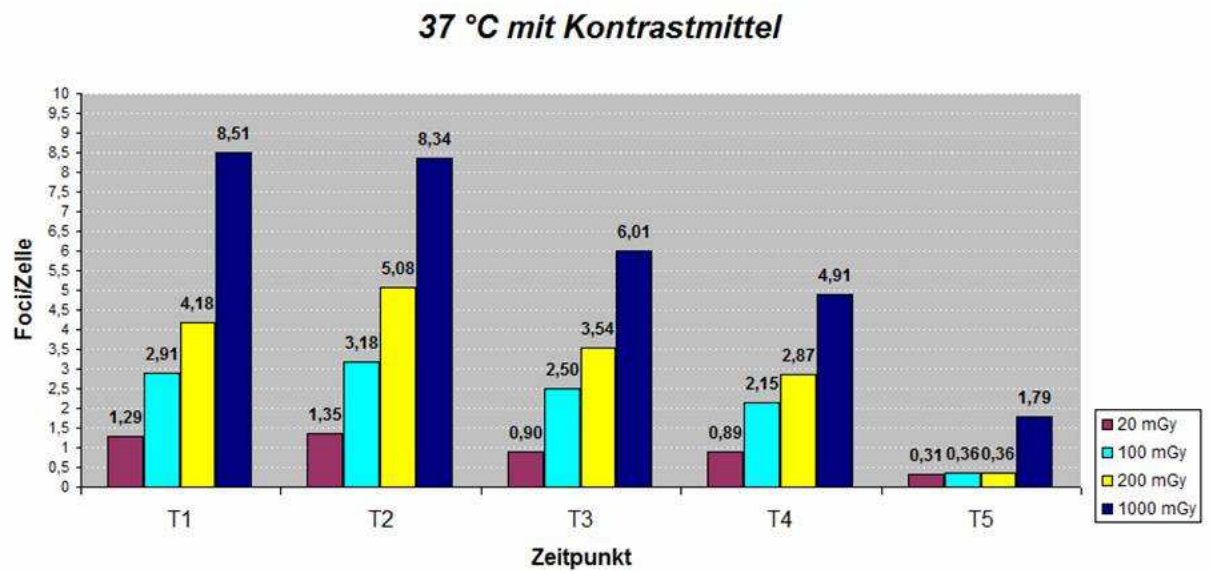


Abbildung 4-5: Kinetik der γ -H2AX-Foci pro Zelle nach applizierter Röntgenstrahlung in humanen Lymphozyten bei 37 °C und Kontrastmittelgabe. Jeder Balken ist der Mittelwert aus vier unabhängigen Zählungen mit jeweils mindestens 40 Zellen und 40 Foci.

4.1.6 γ -H2AX-Foci nach in vitro Bestrahlung von humanen Lymphozyten bei 37 °C ohne Kontrastmittelgabe

Die Ergebnisse zeigten für die Bestrahlung der Lymphozyten bei 37 °C ohne Kontrastmittelgabe einen linearen Anstieg der Focizahl bei allen Strahlendosen bis 30 min nach Bestrahlung sowie einen anschließenden Abfall bis zur letzten Auszählung nach 24 h.

Für die niedrigen Strahlendosen fanden sich zur letzten Auszählung T5 mit der Negativkontrolle vergleichbare Werte. Die Focizahlen bei Bestrahlung mit 200 mGy und 1000 mGy lagen nach der letzten Messung noch über den Werten der Negativkontrolle (s. Tabelle und Abbildung 4-6).

Tabelle 4-6: Tabellarische Ergebnisübersicht nach Bestrahlung: 37 °C ohne Kontrastmittel

	20 mGy	100 mGy	200 mGy	1000 mGy
T1	0,51	1,56	3,43	5,93
T2	0,62	1,94	3,26	6,16
T3	0,51	1,52	2,38	4,65
T4	0,55	1,04	2,37	4,75
T5	0,31	0,38	0,56	1,33

Negativkontrolle: 0,13

Jeder Messwert ist der Mittelwert der vier unabhängigen Zählungen mit jeweils mindestens 40 Zellen und 40 Foci.

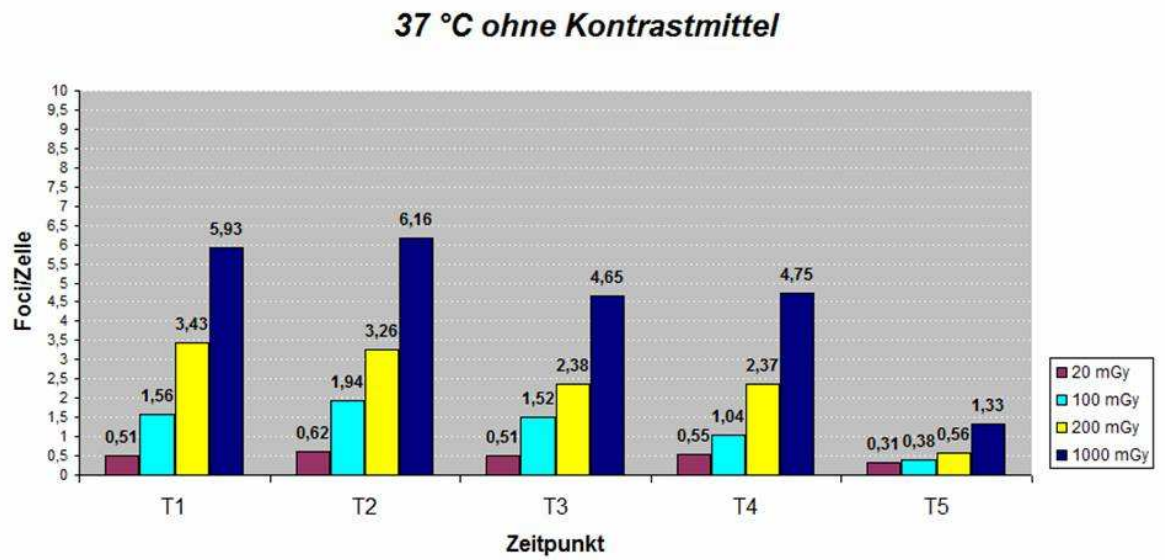


Abbildung 4-6: Kinetik der γ -H2AX-Foci pro Zelle nach applizierter Röntgenstrahlung in humanen Lymphozyten bei 37 °C ohne Kontrastmittelgabe. Jeder Balken ist der Mittelwert aus vier unabhängigen Zählungen mit jeweils mindestens 40 Zellen und 40 Foci.

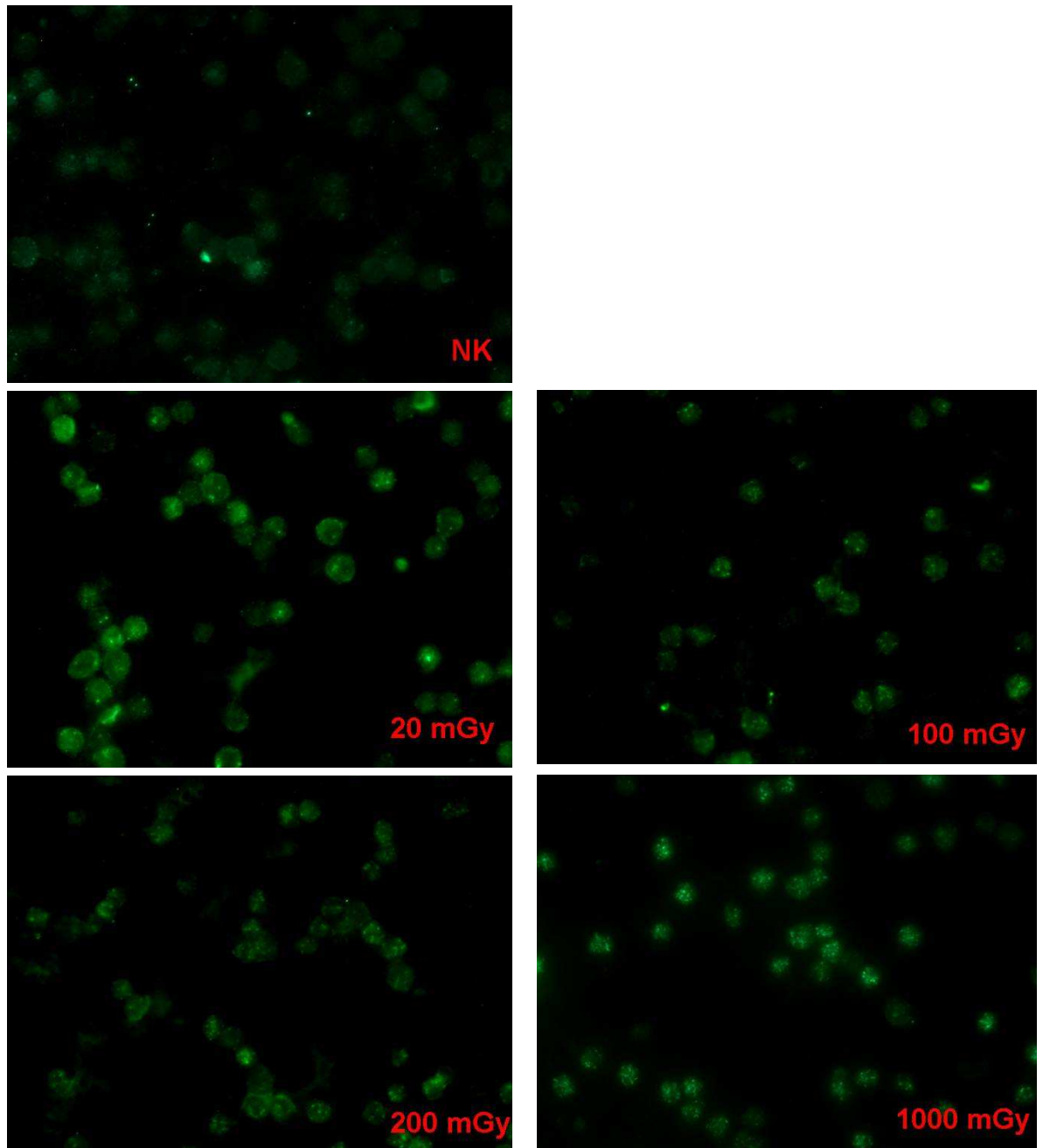


Abbildung 4-7: Lymphozyten mit Anti- γ -H2AX-Immunfluoreszenzfärbung direkt nach in vitro Bestrahlung mit 20 mGy, 100 mGy, 200 mGy, 1000 mGy und ohne Bestrahlung (NK = Negativkontrolle) bei Raumtemperatur mit Kontrastmittel.

4.2 Vergleich der Formation von γ -H2AX-Foci in Anwesenheit und Abwesenheit von jodhaltigem Kontrastmittel

Um den Einfluss von Kontrastmittel auf die Formation der γ -H2AX-Foci zu bestimmen, wurde jeder Versuch mit und ohne jodhaltigem Kontrastmittel durchgeführt. Die pro Zelle induzierten Foci wurde ausgezählt und statistische Unterschiede mit Hilfe des T-Testes ermittelt. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 4-7.

In annähernd allen Strahlengruppen waren die ausgezählten γ -H2AX-Foci in Anwesenheit von Kontrastmittel zu allen Zeitpunkten höher im Vergleich zu den Versuchsreihen ohne Kontrastmittel. In den meisten Fällen konnte dabei ein signifikanter Unterschied ermittelt werden ($p < 0,5$). Diese signifikanten Unterschiede bestanden meist bis mindestens 1 h nach Bestrahlung und wurden in einigen Fällen bis 24 h nach Bestrahlung durch Reparaturmechanismen kompensiert.

Nur bei der Bestrahlungsdosis von 1000 mGy bei Raumtemperatur fand sich nach 24 h eine signifikante Erhöhung der Focizahl in Abwesenheit von Kontrastmittel.

Trotz erhöhter Focizahlen bei Anwesenheit von Kontrastmittel zeigt sich im Vergleich zu den Versuchen ohne Kontrastmittel eine scheinbar schnellere Reparatur der Foci. Die initial bestehenden Unterschiede zwischen den Versuchen mit und ohne Kontrastmittel nähern sich im Verlauf späterer Messungen aneinander an und bestehen zum Zeitpunkt T5 nur noch minimal.

Tabelle 4-7: Vergleich der nach applizierter Röntgenstrahlung in humanen Lymphozyten induzierten γ -H2AX-Foci bei Versuchen mit und ohne Kontrastmittel

Bestrahlungsdosis	Mit Kontrastmittel	Ohne Kontrastmittel	p-Wert
20mGy 4° T1	0,72	0,75	0,59
20mGy 4° T2	0,95	0,95	0,89
20mGy 4° T3	1,04	0,84	0,01
20mGy 4° T4	0,95	0,71	0,03
20mGy 4° T5	0,86	0,62	0,02

20mGy RT T1	0,93	0,80	0,03
20mGy RT T2	1,00	1,07	0,22
20mGy RT T3	0,88	0,73	0,06
20mGy RT T4	0,77	0,66	0,13
20mGy RT T5	0,40	0,33	
20mGy 37° T1	1,29	0,51	< 0,05
20mGy 37° T2	1,35	0,62	< 0,05
20mGy 37° T3	0,90	0,51	< 0,05
20mGy 37° T4	0,89	0,55	0,02
20mGy 37° T5	0,31	0,31	
100mGy 4° T1	2,05	1,71	0,03
100mGy 4° T2	2,63	2,12	< 0,05
100mGy 4° T3	3,43	1,43	< 0,05
100mGy 4° T4	2,15	1,65	< 0,05
100mGy 4° T5	1,85	1,52	0,03
100mGy RT T1	2,64	1,77	< 0,05
100mGy RT T2	2,59	2,20	0,02
100mGy RT T3	1,90	2,05	0,57
100mGy RT T4	1,64	1,96	0,26
100mGy RT T5	0,88	0,69	
100mGy 37° T1	2,91	1,56	< 0,05
100mGy 37° T2	3,18	1,94	< 0,05
100mGy 37° T3	2,50	1,52	0,02
100mGy 37° T4	2,15	1,04	< 0,05
100mGy 37° T5	0,36	0,38	0,75
200mGy 4° T1	4,37	2,59	< 0,05
200mGy 4° T2	4,06	2,81	< 0,05
200mGy 4° T3	4,58	2,46	< 0,05
200mGy 4° T4	3,16	2,29	0,05
200mGy 4° T5	2,14	2,08	0,67
200mGy RT T1	4,08	2,94	0,01
200mGy RT T2	4,97	3,62	< 0,05
200mGy RT T3	4,28	3,56	0,01
200mGy RT T4	4,08	3,19	0,05
200mGy RT T5	1,06	0,79	0,03

200mGy 37° T1	4,18	3,43	0,01
200mGy 37° T2	5,08	3,26	< 0,05
200mGy 37° T3	3,54	2,38	< 0,05
200mGy 37° T4	2,87	2,37	0,03
200mGy 37° T5	0,36	0,56	0,22
1000mGy 4° T1	9,31	6,67	< 0,05
1000mGy 4° T2	7,14	6,30	0,08
1000mGy 4° T3	6,59	5,08	0,04
1000mGy 4° T4	5,32	4,35	0,02
1000mGy 4° T5	3,50	4,19	0,03
1000mGy RT T1	8,39	7,04	0,10
1000mGy RT T2	7,96	7,23	0,18
1000mGy RT T3	6,82	6,60	0,64
1000mGy RT T4	5,91	5,06	0,09
1000mGy RT T5	1,41	1,88	0,01
1000mGy 37° T1	8,51	5,93	0,03
1000mGy 37° T2	8,34	6,16	< 0,05
1000mGy 37° T3	6,01	4,65	< 0,05
1000mGy 37° T4	4,91	4,75	0,56
1000mGy 37° T5	1,79	1,33	0,11

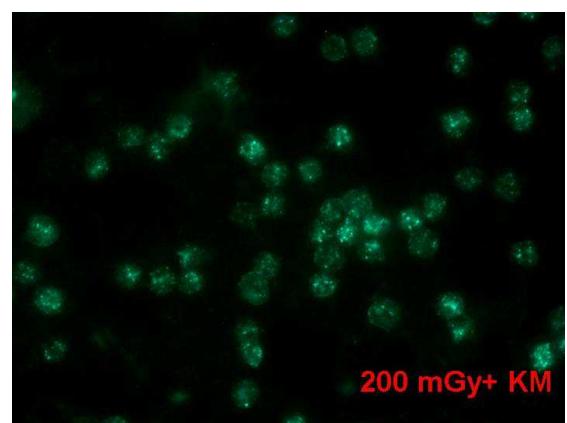
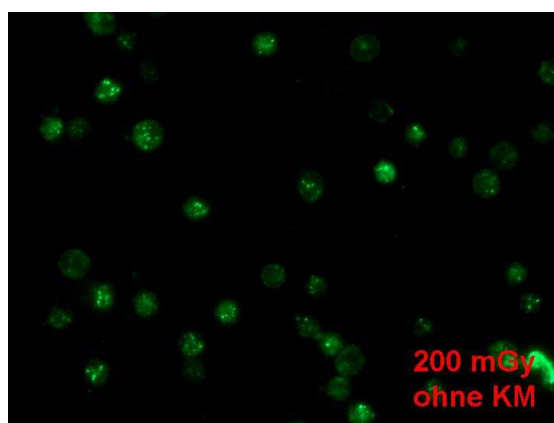


Abbildung 4-8: Lymphozyten mit Anti- γ H2AX-Immunfluoreszenzfärbung direkt nach in vitro Bestrahlung mit 200 mGy bei Raumtemperatur mit und ohne Kontrastmittelgabe.

4.3 Vergleich der Formation von γ -H2AX-Foci in Abhängigkeit von der Temperatur bei Bestrahlung

Zur Klärung der Fragestellung ob durch die Veränderung der Temperatur während der Bestrahlung Unterschiede in der Formation und Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen hervorgerufen werden, wurden die Lymphozyten bei 4 °C, Raumtemperatur und 37 °C mit unterschiedlichen Strahlendosen bestrahlt und die γ -H2AX-Foci zu verschiedenen Zeitpunkten ausgezählt.

In der Tabelle in Anhang 1 findet sich ein Überblick über die dabei pro Zelle ausgezählten Foci. Im Anschluss daran wurde mit Hilfe des T-Testes ermittelt ob die Unterschiede in der Focizahl zwischen den einzelnen Temperaturen signifikant waren (s. Tabelle Anhang 2 und 3).

Direkt nach Bestrahlung fand sich in allen Versuchen ein Anstieg der ausgezählten Foci. In den meisten Fällen zeigt sich bis 30 min nach Bestrahlung ein weiterer Anstieg. Danach fallen die Focizahlen bis zu letzten Auszählung nach 24 h ab.

Alle Versuche ohne Kontrastmittel zeigten die meisten Foci pro Zelle bei Raumtemperatur, gefolgt von der Bestrahlung bei 4 °C. Nach Zusatz von Kontrastmittel konnte dieser Trend nicht mehr beobachtet werden. Nun zeigten sich nur geringe Unterschieden zwischen den Temperaturgruppen.

Ohne Kontrastmittel erreichten alle Gruppen gleichzeitig ihr Maximum an entstandenen Foci, nach ca. 30 Minuten. Durch die Zugabe von Kontrastmittel wurde dieses Maximum für die 4 °C Gruppe um ca. weitere 30 Minuten auf 1 Stunde nach Bestrahlung verschoben.

Die Focizahl war 24 h nach Bestrahlung bei 4 °C im Vergleich zur Negativkontrolle und zu den anderen Temperaturen noch immer erhöht. Dieser Unterschied war unabhängig von Kontrastmittel und Strahlendosis. In allen Gruppen galt, je höher die Bestrahlungsdosis desto größer war auch die Anzahl der verbliebenen Foci. Für die Raumtemperatur und die 37 °C Gruppen fiel die Focizahl in den niedrigeren Bestrahlungsgruppen z.T. wieder bis auf die Werte der Negativkontrolle ab. Insgesamt zeigten sich hier keine Unterschiede zwischen den Gruppen mit und ohne Zusatz von Kontrastmittel.

5. Diskussion

5.1 Formation und Kinetik der γ -H2AX-Foci

Die Einwirkung von Röntgenstrahlung führt durch unterschiedliche Schäden an der DNA zu einem erhöhten Risiko für die Entstehung von Krebs (Berrington de Gonzalez et al. 2004). Es ist bekannt, dass in den USA schätzungsweise 6000 neu aufgetretene Krebserkrankungen pro Jahr auf die Einwirkung ionisierender Strahlung zurückzuführen sind, die bei diagnostischen Verfahren wie Computertomographie, Angiographie und konventionellem Röntgen appliziert werden (Brenner et al. 2001; Haaga 2001; Nickoloff et al. 2001; Thomsen et al. 2003; Herzog et al. 2004). DNA-Doppelstrangbrüche sind seit längerem als eine der signifikantesten Auswirkungen ionisierender Strahlung bekannt (Khanna et al. 2001). Diese Schäden führen zu genetischer Instabilität und können die Rate der Krebsentstehung erhöhen (Vamvakas et al. 1997). Schon ein einziger Doppelstrangbruch kann zum Untergang einer Zelle führen, wenn ein wichtiges Gen inaktiviert oder Apoptose ausgelöst wird (Rich et al. 2000). Im Rahmen dieser Arbeit wurde zur Quantifizierung von DNA-Doppelstrangbrüchen die Darstellung der γ -H2AX-Foci durch Immunfluoreszenz gewählt.

Ich führte die Versuche bei Raumtemperatur, 4 °C und 37 °C, jeweils mit und ohne Kontrastmittel durch. Bei der *in vitro* Bestrahlung humaner Lymphozyten mit Strahlendosen von 20 mGy, 100 mGy, 200 mGy und 1000 mGy konnte gezeigt werden, dass es in allen Versuchen initial nach Bestrahlung zu einem Anstieg der Focizahl kam. Es fand sich eine lineare Abhängigkeit zwischen der Anzahl an γ -H2AX-Foci und der applizierten Dosis an Röntgenstrahlung. Die folgenden Auszählungen zeigten nach Erreichen des Maximalwertes einen kontinuierlichen Rückgang der Focizahlen.

Es ist bekannt, dass γ -H2AX-Foci nach Bestrahlung mit ionisierender Strahlung mit Proteinen kolokalisiert sind, die an der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen beteiligt sind (Paull et al. 2000). In Versuchen zur gezielten Erzeugung von DNA-Doppelstrangbrüchen konnte gezeigt werden, dass sich die γ -H2AX-Foci an diesen Doppelstrangbrüchen bilden, z.B. mit in zelluläre DNA eingebauten ^{125}I -Nukliden (Sedelnikova et al. 2002) oder durch Bestrahlung mit Schwerionen (Jakob et al. 2003).

Die Arbeit von Rothkamm und Löbrich 2003 zeigen den Zusammenhang zwischen der Induktion und Reparatur von DSB nach in vitro Bestrahlung von Fibroblasten und der Formation und Verschwinden der γ -H2AX-Foci. Die Ergebnisse erbrachten den Nachweis, dass ein Focus einen DSB repräsentiert und die Quantifizierung der γ -H2AX-Foci genutzt werden kann, um die Reparatur der DSB in menschlichen Zellen zu messen (Rothkamm et al. 2003a). Der lineare Zusammenhang zwischen der Strahlendosis und der Formation der γ -H2AX-Foci, der in dieser Arbeit gefunden wurde, deckt sich mit den Ergebnissen anderer Studien, in denen bereits dasselbe Verfahren zum Nachweis von DSB nach Bestrahlung in vitro und in vivo angewendet wurde (Rothkamm et al. 2003a; Lobrich et al. 2005; Rothkamm et al. 2007).

Der kontinuierliche Rückgang der Focizahl bis 24 h nach Bestrahlung weist auf die Reparatur der DSB hin (Rothkamm et al. 2003a; Rothkamm et al. 2003b; Kuhne et al. 2004). Diese Ergebnisse unterstützen die Resultate der in vitro und in vivo Versuche vorrausgehender Studien (Ward 1990; Lobrich et al. 2005; Rothkamm et al. 2007; Geisel et al. 2008).

Risikoschätzungen, die auf linearen Explorationen existierender Hochdosisdaten beruhen, gehen davon aus, dass die Reparaturfähigkeit von Schäden durch ionisierende Strahlen unabhängig von der Strahlendosis ist. Frühere Versuche mit Pulsed-Field-Gelelektrophorese (PFGE) demonstrierten, dass der zeitliche Ablauf der Reparatur der DSB unabhängig der initialen Strahlendosis ist (Lobrich et al. 1995). Diese Studien wurden allerdings bei Strahlendosen > 10 Gy durchgeführt und geben keine Aussage über das Reparaturverhalten bei geringeren Dosen. Ich untersuchte die Kinetik des Verschwindens der Foci und gelangte zu dem Ergebnis, dass je mehr Foci initial gemessen wurden, desto höher war die Abnahme der Focizahlen bis 24 h nach

Bestrahlung. Durch den gemessenen linearen Anstieg der Focizahl mit steigender Strahlendosis könnte diese Beobachtung zu der Vermutung führen, dass Strahlenschäden bei verschiedenen Strahlendosen unterschiedlich schnell repariert werden. Diese Beobachtung sollte in zukünftigen Arbeiten genauer untersucht werden.

Unterschiede im zeitlichen Ablauf der Reparatur bei niedrigen Strahlendosen liefern die Studien von Rothkamm und Löbrich 2003, die diese Entdeckung allerdings bei Dosen < 5 mGy machten und ein totales Fehlen der Reparatur nach Bestrahlung mit 1,2 mGy nachweisen konnten (Rothkamm et al. 2003a). Es wird angenommen, dass Zellen eine höhere Radiosensitivität gegenüber geringen Dosen ionisierender Strahlung besitzen, als dies aus Rückinterpolation der Ergebnisse bei höheren Dosen zu erwarten wäre. Dieser Effekt wird als „Low-dose hypersensitivity“ bezeichnet (Joiner et al. 2001; Bonner 2004).

Nach 24 h finden sich abhängig von dem jeweiligen Versuch noch immer erhöhte Focilevel mit Unterschieden zwischen den einzelnen Strahlendosen. Dies unterstützt die Resultate anderer Studien, die erhöhte Fociwerte 24 h nach Bestrahlung in vitro in Fibroblasten (Rothkamm et al. 2003a) und Lymphozyten (Löbrich et al. 2005) zeigten. Rothkamm und Löbrich zeigten bei den Versuchen im Jahr 2003, dass die erhöhten Fociwerte noch bis Tage nach der Bestrahlung erhöht waren, wobei sich keine Unterschiede zwischen den einzelnen Dosen fanden (Rothkamm et al. 2003a). Die persistierenden DSB können theoretisch dadurch erklärt werden, dass eine Untergruppe an Zellen Foci während der Reparatur bilden. Denkbar sind dabei entweder Apoptoseprozesse (Rogakou et al. 2000) oder der sogenannte „Bystander“ Effekt, bei welchem DNA-Schäden in nicht direkt bestrahlten Zellen durch ausgesendete Signale bestrahlter Zellen entstehen (Nagasawa et al. 1992; Prise et al. 1998; Nagasawa et al. 1999; Zhou et al. 2000; Shao et al. 2004; Sedelnikova et al. 2007). Wahrscheinlicher als die Entstehung weiterer Brüche ist, dass die persistierende Focizahl durch unreparierte DSB bestehen bleibt. Diese Annahme wird durch die Resultate anderer Studien gestützt (Rothkamm et al. 2003a; Löbrich et al. 2005).

Mit Erhöhung der Temperatur gehen auch die Focizahlen höherer Dosen in den Bereich der Negativkontrolle zurück, d.h., dass auch Temperaturunterschiede das Reparaturverhalten beeinflussen. Dieser Einfluss soll in 5.3 genauer betrachtet werden.

Andere Arbeitsgruppen konnten bei Versuchen in vivo nach 24 h Focizahlen messen, die nahe der Negativkontrolle waren (Lobrich et al. 2005; Rothkamm et al. 2007). Es kann hier von einer vollständigen Reparatur der DNA-Doppelstrangbrüche ausgegangen werden. Diese Ergebnisse zeigen, wie wichtig die Überprüfung der Ergebnisse in zukünftigen in vivo Versuchen ist. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese Unterschiede auf den verschiedenen Bestrahlungsbedingungen in vivo und in vitro beruhen.

Rothkamm et al. publizierten 2007 pro Gy einen Wert von 29,3 γ -H2AX-Foci pro Zelle in Lymphozyten (Rothkamm et al. 2007). Dieser Wert liegt über den Werten, die im Rahmen dieser Arbeit gemessen wurde. Ursächlich für die Unterschiede könnte sein, dass eine automatische Auswertung bisher nicht möglich ist, so dass eine manuelle und potentiell fehleranfällige Auszählung der Foci erforderlich ist. Die Lage der Foci auf unterschiedlichen Ebenen des Zellkerns machte die Quantifizierung vor allem bei hohen Dosen und einer großen Anzahl an Foci schwierig. Das zeigt sich unter anderem daran, dass die ausgezählten Foci bei geringeren Dosen mit den Resultaten vorangegangener Studien vergleichbar sind (Rothkamm et al. 2003a). Denkbar ist eine Annäherung an diese Ergebnisse durch Verwendung eines konfokalen Mikroskops, welches die genaue Erfassung aller Ebenen des Kernes möglich macht.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Quantifizierung von γ -H2AX-Foci durch Immunhistochemie eine sehr sensitive Methode zur Quantifizierung von DNA-Doppelstrangbrüchen nach Einwirken von ionisierender Strahlung darstellt (Jakob et al. 2003; Pilch et al. 2003; Fernandez-Capetillo et al. 2004). In Studien wurde gezeigt, dass dieses Verfahren in vitro und in vivo bei Lymphozyten anwendbar ist und der Verlust von γ -H2AX-Foci mit der Reparatur der DSB korreliert (Rothkamm et al. 2003a; Lobrich et al. 2005; Rothkamm et al. 2007; Geisel et al. 2008). Die Zahl der DNA-Doppelstrangbrüche korreliert linear mit der Strahlendosis. Nach 24 h findet sich

eine unvollständige Reparatur, so dass das Hintergrundniveau nur bei Steigerung der Temperatur erreicht wurde. Zusätzlich zeigte sich eine umso schnellere Abnahme der Foci je höher die initiale Focizahl war.

5.2 Vergleich der Formation von γ -H2AX-Foci in Anwesenheit und Abwesenheit von jodhaltigem Kontrastmittel

Vorrausgehende Studien haben gezeigt, dass die Messung von DSB durch Auszählung von γ -H2AX-Foci in Lymphozyten des peripheren Blutes eine zuverlässige Methode zur Einschätzung von DNA-Schäden durch diagnostische Röntgenstrahlung, die bei Computertomographie oder Digitaler Subtraktionsangiographie verwendet wird, darstellt (Lobrich et al. 2005; Stiff et al. 2004; Geisel et al. 2008).

In der Literatur finden sich Hinweise, dass die Anwesenheit von jodiertem Kontrastmittel während der in vitro Bestrahlung zu einem Anstieg an chromosomalen Aberrationen in Lymphozyten führt (Adams et al. 1977; Matsubara et al. 1982). Ebenfalls wurden diese chromosomalen Aberrationen und Mikronuklei nach Kontrastmittelgabe bei Angiographie und Urographie in Lymphozyten gefunden (Norman et al. 1978; Dawson et al. 1988; Norman et al. 2001). Allerdings ist noch immer unklar, ob diese Effekte das Resultat erhöhter initialen Schäden, reduzierter Reparaturfähigkeit oder den direkten zytotoxischen Effekten des Kontrastmittels sind (Joubert et al. 2005). Diese Ergebnisse inspirierten mich dazu, den Einfluss von jodhaltigem Kontrastmittel auf DNA-Schäden im Rahmen dieser Arbeit zu untersuchen.

Viele bildgebende Verfahren finden unter der Verwendung jodhaltiger Kontrastmittel statt, deren Nieren- und zytotoxischen Effekte teilweise bereits bekannt sind (Norman et al. 1978; Thomsen et al. 2003; Haller et al. 2004; Joubert et al. 2005; Toprak 2007; Solomon 2007).

Allerdings gibt es kaum Studien darüber, ob die Verwendung jodhaltiger Kontrastmittel Einfluss auf die Entstehung und Reparatur von DNA-Schäden, die durch diagnostische Röntgenstrahlung verursacht wurden, haben.

Die Ergebnisse zeigen, dass durch die Anwesenheit von jodhaltigem Kontrastmittel die Anzahl der γ -H2AX-Foci direkt nach Bestrahlung signifikant gesteigert wurde. Diese Resultate decken sich mit den Studien von Grudzenski 2009, welche ebenfalls einen Anstieg der Focilevel bei Anwesenheit von Kontrastmittel sowohl bei Bestrahlung von Lymphozyten *in vitro* wie auch bei Injektion des Kontrastmittels vor Computertomographie zeigen konnten (Grudzenski et al. 2009). Es ist sehr wahrscheinlich, dass diese Ergebnisse die Folge der Generierung zusätzlicher Sekundärelektronen ist, die bei der Absorption der Röntgenstrahlen durch das Kontrastmittel entstehen. Bedingt durch die hohe Ordnungszahl absorbieren jodhaltige Kontrastmittel mehr Röntgenstrahlen als menschliches Weichteilgewebe (Thomsen et al. 2003; Brink 2003; Fleischmann 2003). Die Generation von sekundären Auger-Elektronen ist linear abhängig von der Anzahl der absorbierten Photonen. Diese Sekundärelektronen sind die Hauptursache der DNA-Schäden durch Röntgenstrahlung (Kraft et al. 1992; Hill 2004).

Zwar führen die Ergebnisse zu der Annahme, dass die Anwesenheit von Kontrastmittel während der Bestrahlung die Anzahl der Strahlen induzierten DSB erhöht, es zeigte sich aber keine Einschränkung der Fähigkeit zur RepARATION dieser Schäden. Diese Behauptung ergibt sich aus der Auszählung der γ -H2AX-Foci im Verlauf über die Zeit. Zwar sind die Focilevel zu allen Zeitschritten höher in Anwesenheit von Kontrastmittel, jedoch nimmt die Differenz bis zur letzten Auszählung zwischen den Werten mit und ohne Kontrastmittel stark ab. Nach 24 h finden sich unabhängig von der Kontrastmittelgabe zum Teil noch immer erhöhte Fociwerte.

Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen zeigten, dass in Anwesenheit von Kontrastmittel bei Versuchen *in vivo* und *in vitro* initial die Anzahl an γ -H2AX-Foci anstieg, die Reparatur der DSB dadurch aber nicht beeinflusst wurde. Die Gabe von Kontrastmittel nach Bestrahlung hatte keine Auswirkung auf die Höhe der Focilevel (Grudzenski et al. 2009).

Im medizinischen Alltag werden heute zur Diagnostik tausende radiologische Verfahren mit der zusätzlichen Gabe von jodhaltigem Kontrastmittel durchgeführt.

Bislang galten die Vorsichtsmaßnahmen bei der Applikation vor allem möglichen allergischen Reaktionen sowie durch die Nephrotoxizität der jodhaltigen Kontrastmittel bedingten Nierenschädigungen (Gueant-Rodriguez et al. 2006; Davidson et al. 2008; Singh et al. 2008). Meine Ergebnisse erbrachten den Nachweis, dass durch die Gabe jodhaltiger Kontrastmittel zusätzlich die Anzahl an DNA-Schäden nach Bestrahlung erhöht wird. Diese Erkenntnisse sollten zukünftig zwei wichtige Folgerungen haben: Erstens können die Auswirkungen der ionisierenden Strahlung nicht einfach mit einem Dosimeter, bzw. dem Dosislängenprodukt bei der Computertomographie gemessen werden, sondern sensitivere Methoden, wie die Analyse der γ -H2AX-Foci, sollten überdacht werden. Zweitens sollte die Verwendung jodhaltiger Kontrastmittel noch vorsichtiger als bisher überdacht werden. Speziell in sich wiederholenden Untersuchungen wie z.B. Follow-up Untersuchungen sollte die Notwendigkeit der Kontrastmittelgabe sorgfältiger geprüft werden.

Bisher ist nur wenig über den Einfluss von jodhaltigem Kontrastmittel auf Strahlenschäden an der DNA bekannt. Die durchgeführten Untersuchungen zeigten klar, dass die Kontrastmittelgabe die Höhe der DNA-Schäden beeinflusst. Ob dieser Einfluss ebenfalls in vivo gemessen werden kann, sollte in zukünftigen Studien überprüft werden.

Des Weiteren untersuchte ich DNA-Schäden in Lymphozyten des peripheren Blutes. Diese Ergebnisse bedeuten allerdings nicht, dass ähnliche Schäden ebenfalls in solidem Organewebe entsteht, da die Konzentration des Kontrastmittels in soliden Organen geringer ist. DNA-Schäden in soliden Organen sollten in Tiermodellen untersucht werden (Rube et al. 2008).

5.3 Vergleich der Formation von γ -H2AX-Foci in Abhängigkeit von der Temperatur bei Bestrahlung

Hyperthermische Temperaturen zwischen 40-46 °C werden therapeutisch in der Krebstherapie z.B in Kombination mit Bestrahlung eingesetzt (Ohnishi et al. 2001). Der vorrangige Effekt der Hitzeinwirkung ist das Abtöten der Zelle (Roti Roti 2008). Die molekularen Mechanismen dieses durch Hitze induzierten Zelltodes sind noch immer nicht vollständig verstanden.

In letzter Zeit wurden Hitze-induzierte γ -H2AX-Foci beschrieben (Takahashi et al. 2004). Ein γ -H2AX-Foci repräsentiert einen DNA-Doppelstrangbruch (Rothkamm et al. 2003a). Es wird angenommen, dass die durch Hitze induzierten DSB durch die Formation von Radikalen in vivo (Bruskov et al. 2002) und durch Denaturierung von hitzelabilen Reparaturenzymen (Hall et al. 1994; Takahashi et al. 2008) entstehen.

Der Strahlen-modifizierende Effekt von hyperthermischen Temperaturen wurde in vorrausgehenden Arbeiten ausführlich untersucht. Über die Kombination von Bestrahlung und hypothermische Temperaturen existieren nur wenige Forschungsergebnisse. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Verbindung zwischen verschiedenen Temperaturen und der Formation und Kinetik von γ -H2AX-Foci durch die Methode der Immunfluoreszenzfärbung genauer untersucht werden.

Die Resultate zeigten, dass es wichtige Unterschiede zwischen den Versuchen bei unterschiedlichen Temperaturen gibt. Bei den Versuchen ohne Kontrastmittel konnten die höchsten Focizahlen bei Raumtemperatur, gefolgt von den Versuchen bei 4 °C auszählt werden. Dieser Trend wurde in den Versuchen mit Kontrastmittel nicht festgestellt. Es zeigte sich, dass je geringer die Temperatur während der Bestrahlung, desto langsamer ist die Formation der γ -H2AX-Foci. Dieses Ergebnis konnte nur bei Anwesenheit von Kontrastmittel beobachtet werden.

Durch Phosphorylierung des Histons H2AX in der Nähe von DSB entsteht γ -H2AX (Rogakou et al. 1998; Rogakou et al. 1999). Vermittelt wird die Phosphorylierung durch die Phosphatidylinositol 3-kinase- ähnliche Familie der Proteinkinasen (PIKKs). Bei Schäden durch ionisierende Strahlung stellt wahrscheinlich ATM (ataxia teleangiectasia mutated), die führende Kinase dar (Paull et al. 2000; Burma et al. 2001; Stiff et al. 2004). Diese Modifikation des Chromatins ist wichtig für sich anschließende Reparaturprozesse (Fernandez-Capetillo et al. 2002). Viele Komponenten der DNA-Schadensantwort wie ATM, BRCA1, 53BP1, MDC1, RAD51 und der MRE11/RAD50/NBS1 (MRN) Komplex bilden Foci aus (ionizing radiation induced foci= IRIF), die mit γ -H2AX-Foci kolokalisiert zu finden sind. Somit ist H2AX ein wichtiger Faktor während der DNA-Schadensantwort (Celeste et al. 2002).

Meine Resultate zeigten, dass die Entstehung der γ -H2AX Foci bei niedrigen Temperaturen verzögert ist. Dies kann möglicherweise dadurch erklärt werden, dass bei niedrigeren Temperaturen die enzymatische Aktivität von Reparaturproteinen gesenkt wird. Tatsächlich zeigten Analysen über die Kinetik der DNA-Reparatur, dass Zellen, die auf Eis gelegt und bestrahlt wurden gehemmte DNA-Reparaturkapazitäten aufwiesen (Gradzka et al. 2005; Brehwens et al. 2010). Wenn dies der Fall ist, können niedrige Temperaturen zu genomischen Instabilitäten und Mutationen führen (Bassing et al. 2002; Bassing et al. 2003; Celeste et al. 2003; Bogliolo et al. 2007). Schon 1969 haben Studien von Bajerska und Liniecki geringere chromosomale Aberrationen bei Bestrahlung des Blutes unter Raumtemperatur wie bei einer Exposition bei 37 °C gezeigt (Bajerska et al. 1969). Ebenfalls haben Gumrich et al. (Gumrich et al. 1986) und Virsik-Peuckert und Harder (Virsik-Peuckert et al. 1986) einen Abfall in der Häufigkeit strahlen-induzierter Aberrationen bei niedrigen Temperaturen finden können.

Versuche anderer Arbeitsgruppen zeigten, dass mit abnehmenden Temperaturen die Induktion von DSB reduziert wurde und somit niedrige Temperaturen protektiv wirken. Der Temperatureffekt wird nach deren Ansicht durch die indirekten Einflüsse der ionisierenden Strahlung wie z.B. über reaktive Sauerstoffspezies bedingt, konnte jedoch in intakten Zellen nicht nachgewiesen werden (Elmroth et al. 2000; Elmroth et al. 2003). Möglich ist, dass diesem initialen Effekt durch eine gesteigerte Reparatur bei

höheren Temperaturen entgegengewirkt wird (Ward et al. 1991). Andere Studien zeigen eine höhere Frequenz an Mikronuklei bei Temperaturen von 37 °C als dies bei 4 °C der Fall war. Trotzdem konnte kein Effekt der Temperatur auf initiale DNA-Schäden mit dem Comet Assay gezeigt werden (Brzozowska et al. 2009).

Vorrausgehende Studien demonstrierten vermehrte γ -H2AX Foci bei Hyperthermie (45-47 °C) und folgerten, dass durch Hitzeeinwirkung DSB erzeugt werden (Takahashi et al. 2004; Kaneko et al. 2005). Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass im Gegensatz zu diesen hohen Temperaturen die Reparatur von DSB bei Temperaturen um 37 °C möglich war (Nevaldine et al. 1994).

Meine Ergebnisse zeigten, dass die Anzahl an γ -H2AX Foci zunächst in den Versuchen bei Raumtemperatur am höchsten war und bei den Versuchen bei 37 °C die niedrigsten Focizahlen ausgezählt wurden. Daraus ergibt sich ein Temperaturbereich zwischen Hyperthermie und Hypothermie (< 37 °C), in dem die initiale Induktion der Foci am geringsten ist und damit die durch Strahlung induzierten Schäden an der DNA. Warum sich dieser Trend nur in Versuchen ohne Kontrastmittel zeigt, sollte in zukünftigen Studien untersucht werden.

Die Versuche dieser Arbeit sollten nicht nur Aufschluss über die initiale Formation der γ -H2AX Foci geben, sondern auch durch Auszählung zu verschiedenen Zeitpunkten Hinweise darüber, wie die DSB bei unterschiedlichen Temperaturen repariert werden. Nach 24 h finden sich unabhängig von der Kontrastmittelgabe die höchsten Focizahlen für Bestrahlung bei 4 °C. Aus diesen Ergebnissen schließe ich, dass je niedriger die Temperatur bei Bestrahlung, desto eingeschränkter die Reparatur der DSB. Bei 37 °C und Raumtemperatur erreichen die Foci z.T. das Level der Negativkontrolle, wobei die Werte bei Raumtemperatur die der Versuche bei 37 °C übersteigen. Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass je höher die Temperatur, desto besser ist die Reparatur der DSB. Unter Beachtung der Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen (Nevaldine et al. 1994; Roti Roti et al. 2010; Takahashi et al. 2010), vermute ich ein bestehendes Temperaturoptimum für Reparaturenzyme. Sehr hohe, ebenso wie Temperaturen unter 37 °C scheinen die Funktion der Reparatur einzuschränken.

Studien über den Einfluss unterschiedlicher Temperaturen auf die Induktion von Strahlen induzierten DSB sind selten und widersprüchlich (WEISS 1960; BELLI et al. 1963; Winans et al. 1972; MacLeod et al. 1990; Redpath et al. 1995; Elmroth et al. 1999; Elmroth et al. 2000; Elmroth et al. 2003; Brzozowska et al. 2009; Brehwens et al. 2010). Die hier gewählte Methode der Quantifizierung der γ -H2AX-Foci mittels Immunfluoreszenzfärbung, als Goldstandart (Fernandez-Capetillo et al. 2004) zur Detektion von DSB, fand in keiner dieser Studien Verwendung.

Eine weitere Fragestellung war, wie sich die Anzahl der Foci im Verlauf der Zeit bei den verschiedenen Temperaturen verändern, um Aufschluss über die Reparatur der DSB zu erhalten. Die Tatsache, dass dazu kaum Daten in der aktuellen Literatur existieren zeigt, wie wichtig es war, im Rahmen dieser Studie die Anzahl der γ -H2AX-Foci über einen längeren Zeitraum zu messen. Wenn Reparaturenzyme bei bestimmten Temperaturen effizienter arbeiten, sollte dies in der radiologischen Diagnostik Beachtung finden und die Bedingungen während der Bestrahlung entsprechend angepasst werden.

5.4 Methodik

Die Immunfluoreszenzfärbung von γ -H2AX-Foci ist ein geeignetes Verfahren zur Darstellung von DNA-Doppelstrangbrüchen. Wie auch in dieser Arbeit dargestellt wurde, verhält sich die Induktion der Foci proportional zu der applizierten Dosis an Röntgenstrahlung.

Es ist gegenwärtig allgemein akzeptiert, dass γ -H2AX-Foci in der Umgebung von DNA-Doppelstrangbrüchen entstehen. Dieses Erklärungsmodell wird von einem großen Teil der vorliegenden Literatur unterstützt (Paull et al. 2000; Burma et al. 2001; Ward et al. 2001; Redon et al. 2002; Furuta et al. 2003; Fernandez-Capetillo et al. 2004; Foster et al. 2005; Halicka et al. 2005; Huang et al. 2005; Takahashi et al. 2005; Stucki et al. 2006). Trotzdem gibt es auch Arbeiten die zeigen, dass γ -H2AX-Foci nicht ausschließlich durch DNA-Doppelstrangbrüche induziert werden. Marti et al. konnten

2006 eine diffuse Phosphorylierung von H2AX während der G1-Phase zeigen (Marti et al. 2006). Eine andere Arbeitsgruppe wies die Bildung von γ -H2AX-Foci nach MNNG-Exposition (NMethyl-N'-Nitro-Nitroso-Guanidin) nach, die offenbar durch nichtreparable Läsionen verursacht wurden. Diese konnten nicht als DNA-Doppelstrangbrüche interpretiert werden (Stojic et al. 2004). Die tatsächliche Spezifität dieser Methode bleibt also noch fraglich.

Fest steht, dass durch die Messung der γ -H2AX-Foci ein sensitives Verfahren entwickelt wurde, das die Nachweisgrenze von DNA-Doppelstrangbrüchen nach Einwirken ionisierender Strahlung von einigen Gray auf einige mGray senkt und dieses Verfahren in vitro und in vivo bei Lymphozyten anwendbar ist (Rothkamm et al. 2003a; Rothkamm et al. 2007; Geisel et al. 2008). Die Analyse von Lymphozyten hat den Vorteil, dass die Zellen leicht und schnell gewonnen werden können, ohne die Notwendigkeit größerer medizinischer Interventionen (Lobrich et al. 2005).

In der verwendeten Methode vereinen sich wichtige Anforderungen, die an ein ideales Verfahren zur biologischen Dosisbestimmung gestellt werden müssen: Neben der bereits erwähnten Sensitivität für sehr geringe Strahlendosen, der linearen Dosis-Wirkung-Kurve über einen breiten Dosisbereich, können die Proben einfach gewonnen werden und es ist möglich, eine Exposition von Teilen des Körpers im systemisch zirkulierenden Blut zu detektieren. Die Analyse der γ -H2AX-Foci wird von verschiedenen Autoren zur biologischen Dosimetrie als wesentlich sensitivere Methode im Vergleich zu konventionellen Techniken vorgeschlagen (Geisel et al. 2008; Rothkamm et al. 2007; Grudzenski et al. 2009).

Allerdings zeigen die Erfahrungen mit dieser Methode auch Beschränkungen in der allgemeinen Anwendung: Der schnelle Verlust des Signals (ca. 50 % innerhalb der ersten Stunde) macht es einerseits unmöglich, eine Auswertung ohne genaue Kenntnis des Expositionszeitpunktes durchzuführen, andererseits können länger zurückliegende Ereignisse nicht mehr erfasst werden. Dies wäre beispielsweise zur Messung der Belastung bei Unfällen mit Röntgenstrahlung oder Radioaktivität wünschenswert. Weiter zeigte sich, dass weniger Foci/Gy auszählen konnten als dies in vorherigen Studien möglich war (Rothkamm et al. 2003a). Die Foci befinden sich auf

unterschiedlichen Ebenen des Zellkerns. Der schnelle Verlust des Signals macht die komplette Erfassung aller Foci schwierig. Dies konnte besonders bei hohen Focizahlen beobachtet werden. Genauer wäre die Verwendung eines konfokalen Mikroskops, mit dem alle Ebenen des Zellkerns erfasst werden können. Darüber hinaus ist eine automatische Auswertung bisher nicht möglich, so dass eine manuelle und potentiell fehleranfällige Auszählung der Foci erforderlich ist.

5.5 Ausblick

Viele Aspekte der Schädigung und Reparatur der DNA sind noch unbekannt oder nur zum Teil verstanden. Hier müssen weitere Fortschritte in der Grundlagenforschung erzielt werden, um beispielsweise den genauen Interaktionsmechanismus zwischen ionisierender Strahlung und dem DNA-Molekül aufzudecken. Ebenso ist bisher noch unbekannt, wie und in welchem Maße ein DNA-Doppelstrangbruch zur Entstehung von Krebs führen kann. Viele Signaltransduktionskaskaden sind zwar bekannt, dennoch liegen große Teile der Krebsentstehung noch im Dunkeln.

Die Tatsache, dass nach 24 h noch immer erhöhte γ -H2AX-Foci gefunden wurden, gibt Anlass zur Besorgnis und sollte weitere Studien nach sich ziehen. Interessant wäre, ab welchem Zeitpunkt die Foci wieder auf das Niveau der Negativkontrolle absinken. Welchen Einfluss Effekte wie „Bystander Effect“ und „Low-dose-hypersensitivity“ tatsächlich auf unsere Ergebnisse haben, sollte in zukünftigen Forschungen überprüft werden.

Die hier verwendete Immunfluoreszenzfärbung von γ -H2AX-Foci eignet sich zur Darstellung von DNA-Doppelstrangbrüchen nach Einwirken von ionisierender Strahlung und ist dabei ein sensitives Verfahren. Es soll zukünftig in unserem Labor für weitere Forschungen eingesetzt und optimiert werden. Zu Verbesserungen zählen z.B. die Verwendung eines konfokalen Mikroskops. Die Entwicklung einer automatischen Auswertung der Proben würde die Fehleranfälligkeit der Auswertung möglicherweise weiter minimieren.

Mit diesem Verfahren zur Analyse der DNA-Doppelstrangbrüche könnte in Zukunft eine Dosisbestimmung in Fällen durchgeführt werden, in denen die konventionelle Dosimetrie an ihre Grenzen stößt - beispielsweise bestimmte strahlentherapeutische Anwendungen oder komplexe interventionsradiologische Eingriffe. Auch eine Berücksichtigung der individuellen DNA-Reparaturkapazität, beispielsweise bei einer Chemo- oder Strahlentherapie, wäre denkbar. Möglich ist auch die Anwendung zur Messung der Strahlenwirkung am therapeutisch Tätigen. Gerade im Rahmen der Interventionsradiologie besteht trotz aller Strahlenschutzmaßnahmen eine Strahlenexposition des behandelnden Arztes und des assistierenden Personals. Messungen der DNA-Doppelstrangreparatur nach verschiedenen Eingriffen beim medizinischen Personal sollten Hinweise auf die biologische Strahlenwirkung geben können. Der Vorteil einer solch sensitiven Methode, um das tatsächliche Level an Strahlenschäden in einem menschlichen Körper zu untersuchen, ist besonders bei der Verwendung Dosis-modifizierender Faktoren, wie der Verwendung von Kontrastmittel, zu empfehlen.

Meine Ergebnisse zeigten eine Erhöhung der DSB unter Verwendung von jodiertem Kontrastmittel bei Bestrahlung. Durch diese Ergebnisse muss die Indikation dieser Kontrastmittel in Zukunft noch sorgfältiger geprüft werden.

Ob erhöhte DNA-Schäden auch in soliden Organen gemessen werden können sollte in zukünftige Arbeiten an Tiermodellen untersucht werden.

Schließlich ist eine Untersuchung von anderen Zelltypen vorstellbar. Beispielsweise könnte eine Biopsie zur Analyse von Hautfibroblasten aus der behandelten Extremität zum direkten Nachweis der lokalen Strahlenfolgen durchgeführt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit zeigten sich wichtige Unterschiede in der Höhe der DSB zwischen den Versuchen mit Kontrastmittel und bei unterschiedlichen Temperaturen. In zukünftigen Untersuchungen muss vor allem geprüft werden, ob diese Ergebnisse tatsächlich auch in vivo gefunden werden können.

Literaturverzeichnis

- Adams, F.H., A. Norman, R.S. Mello und D. Bass, (1977). "Effect of radiation and contrast media on chromosomes. Preliminary report." Radiology **124**(3): 823-6.
- Altaf, M., N. Saksouk und J. Cote, (2007). "Histone modifications in response to DNA damage." Mutat Res **618**(1-2): 81-90.
- Bajerska, A. und J. Liniecki, (1969). "The influence of temperature at irradiation in vitro on the yield of chromosomal aberrations in peripheral blood lymphocytes." Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med **16**(5): 483-93.
- Bassing, C.H., H. Suh, D.O. Ferguson, K.F. Chua, J. Manis, M. Eckersdorff, M. Gleason, R. Bronson, C. Lee und F.W. Alt, (2003). "Histone H2AX: a dosage-dependent suppressor of oncogenic translocations and tumors." Cell **114**(3): 359-70.
- Bassing, C.H., K.F. Chua, J. Sekiguchi, H. Suh, S.R. Whitlow, J.C. Fleming, B.C. Monroe, D.N. Ciccone, C. Yan, K. Vlasakova, D.M. Livingston, D.O. Ferguson, R. Scully und F.W. Alt, (2002). "Increased ionizing radiation sensitivity and genomic instability in the absence of histone H2AX." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(12): 8173-8.
- BELLI, J.A. und F.J. BONTE, (1963). "Influence of temperature on the radiation response of mammalian cells in tissue culture." Radiat Res **18**: 272-6.
- Berrington de Gonzalez, A. und S. Darby, (2004). "Risk of cancer from diagnostic X-rays: estimates for the UK and 14 other countries." Lancet **363**(9406): 345-51.
- Bogliolo, M., A. Lyakhovich, E. Callen, M. Castella, E. Cappelli, M.J. Ramirez, A. Creus, R. Marcos, R. Kalb, K. Neveling, D. Schindler und J. Surralles, (2007). "Histone H2AX and Fanconi anemia FANCD2 function in the same pathway to maintain chromosome stability." EMBO J **26**(5): 1340-51.
- Bonner, W.M., (2004). "Phenomena leading to cell survival values which deviate from linear-quadratic models." Mutat Res **568**(1): 33-9.
- Bowden, G.T. und M.D. Kasunic, (1981). "Hyperthermic potentiation of the effects of a clinically significant X-ray dose on cell survival, DNA damage, and DNA repair." Radiat Res **87**(1): 109-20.
- Breen, A.P. und J.A. Murphy, (1995). "Reactions of oxyl radicals with DNA." Free Radic Biol Med **18**(6): 1033-77.
- Brehwens, K., E. Staaf, S. Haghdoust, A.J. Gonzalez und A. Wojcik, (2010). "Cytogenetic damage in cells exposed to ionizing radiation under conditions of a changing dose rate." Radiat Res **173**(3): 283-9.
- Breimer, L.H. und T. Lindahl, (1985). "Thymine lesions produced by ionizing radiation in double-stranded DNA." Biochemistry **24**(15): 4018-22.

- Brenner, D.J. und C.D. Elliston, (2004). "Estimated radiation risks potentially associated with full-body CT screening." Radiology **232**(3): 735-8.
- Brenner, D.J., (2004). "Radiation risks potentially associated with low-dose CT screening of adult smokers for lung cancer." Radiology **231**(2): 440-5.
- Brenner, D.J., C.D. Elliston, E.J. Hall und W.E. Berdon, (2001). "Estimates of the cancer risks from pediatric CT radiation are not merely theoretical: comment on 'point/counterpoint: in x-ray computed tomography, technique factors should be selected appropriate to patient size. against the proposition'." Med Phys **28**(11): 2387-8.
- Brenner, D.J., R. Doll, D.T. Goodhead, E.J. Hall, C.E. Land, J.B. Little, J.H. Lubin, D.L. Preston, R.J. Preston, J.S. Puskin, E. Ron, R.K. Sachs, J.M. Samet, R.B. Setlow und M. Zaider, (2003). "Cancer risks attributable to low doses of ionizing radiation: assessing what we really know." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(24): 13761-6.
- Brink, J.A., (2003). "Contrast optimization and scan timing for single and multidetector-row computed tomography." J Comput Assist Tomogr **27 Suppl 1**S3-8.
- Bruskov, V.I., L.V. Malakhova, Z.K. Masalimov und A.V. Chernikov, (2002). "Heat-induced formation of reactive oxygen species and 8-oxoguanine, a biomarker of damage to DNA." Nucleic Acids Res **30**(6): 1354-63.
- Brzozowska, K., C. Johannes, G. Obe, R. Hentschel, J. Morand, R. Moss, A. Wittig, W. Sauerwein, J. Liniecki, I. Szumiel und A. Wojcik, (2009). "Effect of temperature during irradiation on the level of micronuclei in human peripheral blood lymphocytes exposed to X-rays and neutrons." Int J Radiat Biol **85**(10): 891-9.
- Burma, S. und D.J. Chen, (2004). "Role of DNA-PK in the cellular response to DNA double-strand breaks." DNA Repair (Amst) **3**(8-9): 909-18.
- Burma, S., B.P. Chen, M. Murphy, A. Kurimasa und D.J. Chen, (2001). "ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks." J Biol Chem **276**(45): 42462-7.
- Burma, S., B.P.C. Chen und D.J. Chen, (2006). "Role of non-homologous end joining (NHEJ) in maintaining genomic integrity." DNA Repair (Amst) **5**(9-10): 1042-8.
- Cadet, J. und M. Berger, (1985). "Radiation-induced decomposition of the purine bases within DNA and related model compounds." Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med **47**(2): 127-43.
- Celeste, A., S. Difilippantonio, M.J. Difilippantonio, O. Fernandez-Capetillo, D.R. Pilch, O.A. Sedelnikova, M. Eckhaus, T. Ried, W.M. Bonner und A. Nussenzweig, (2003). "H2AX haploinsufficiency modifies genomic stability and tumor susceptibility." Cell **114**(3): 371-83.

- Celeste, A., S. Petersen, P.J. Romanienko, O. Fernandez-Capetillo, H.T. Chen, O.A. Sedelnikova, B. Reina-San-Martin, V. Coppola, E. Meffre, M.J. Difilippantonio, C. Redon, D.R. Pilch, A. Olaru, M. Eckhaus, R.D. Camerini-Otero, L. Tessarollo, F. Livak, K. Manova, W.M. Bonner, M.C. Nussenzweig und A. Nussenzweig, (2002). "Genomic instability in mice lacking histone H2AX." Science **296**(5569): 922-7.
- Charles, M., (2001). "UNSCEAR report 2000: sources and effects of ionizing radiation. United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation." J Radiol Prot **21**(1): 83-6.
- Collins, A.R., (2004). "The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations." Mol Biotechnol **26**(3): 249-61.
- Corry, P.M., S. Robinson und S. Getz, (1977). "Hyperthermic effects on DNA repair mechanisms." Radiology **123**(2): 475-82.
- Cosset, J.M., M. Maher und J.L. Habrand, (1995). "New particles in radiotherapy: an introduction." Radiat Environ Biophys **34**(1): 37-9.
- Costanzo, V., K. Robertson, M. Bibikova, E. Kim, D. Grieco, M. Gottesman, D. Carroll und J. Gautier, (2001). "Mre11 protein complex prevents double-strand break accumulation during chromosomal DNA replication." Mol Cell **8**(1): 137-47.
- Cox, M.M., (2002). "The nonmutagenic repair of broken replication forks via recombination." Mutat Res **510**(1-2): 107-20.
- Cremer, T. und C. Cremer, (2001). "Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells." Nat Rev Genet **2**(4): 292-301.
- Davidson, C.J. und A.K. Erdogan, (2008). "Contrast media: procedural capacities and potential risks." Rev Cardiovasc Med **9 Suppl 1** S24-34.
- Dawson, P., M. Penhaligon, E. Smith und J. Saunders, (1988). "Synergistic cytotoxicity of iodinated contrast agents and x-radiation." Invest Radiol **23 Suppl 1** S110-3.
- Dianov, G.L., P. O'Neill und D.T. Goodhead, (2001). "Securing genome stability by orchestrating DNA repair: removal of radiation-induced clustered lesions in DNA." Bioessays **23**(8): 745-9.
- Dietzel, F., (1983). "Basic principles in hyperthermic tumor therapy." Recent Results Cancer Res **86** 177-90.
- Dikomey, E. und H. Jung, (1991). "Thermal radiosensitization in CHO cells by prior heating at 41-46 degrees C." Int J Radiat Biol **59**(3): 815-25.
- Dikomey, E., (1982). "Effect of hyperthermia at 42 and 45 degrees C on repair of radiation-induced DNA strand breaks in CHO cells." Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med **41**(6): 603-14.

- Dizdaroglu, M., M.L. Dirksen, H.X. Jiang und J.H. Robbins, (1987).
 "Ionizing-radiation-induced damage in the DNA of cultured human cells.
 Identification of 8,5-cyclo-2-deoxyguanosine." Biochem J **241**(3): 929-32.
- Dudas, A. und M. Chovanec, (2004). "DNA double-strand break repair by homologous recombination." Mutat Res **566**(2): 131-67.
- Elliott, B. und M. Jasin, (2002). "Double-strand breaks and translocations in cancer." Cell Mol Life Sci **59**(2): 373-85.
- Elmroth, K., J. Nygren, B. Stenerlow und R. Hultborn, (2003).
 "Chromatin- and temperature-dependent modulation of radiation-induced double-strand breaks." Int J Radiat Biol **79**(10): 809-16.
- Elmroth, K., J. Nygren, L.J. Erkelley und R. Hultborn, (2000). "Radiation-induced double-strand breaks in mammalian DNA: influence of temperature and DMSO." Int J Radiat Biol **76**(11): 1501-8.
- Elmroth, K., L.J. Erkelley und R. Hultborn, (1999). "Influence of temperature on radiation-induced inhibition of DNA supercoiling." Radiat Res **152**(2): 137-43.
- Fairbairn, D.W., P.L. Olive und K.L. O'Neill, (1995). "The comet assay: a comprehensive review." Mutat Res **339**(1): 37-59.
- Fernandez-Capetillo, O., A. Celeste und A. Nussenzweig, (2003). "Focusing on foci: H2AX and the recruitment of DNA-damage response factors." Cell Cycle **2**(5): 426-7.
- Fernandez-Capetillo, O., A. Lee, M. Nussenzweig und A. Nussenzweig, (2004).
 "H2AX: the histone guardian of the genome." DNA Repair (Amst) **3**(8-9): 959-67.
- Fernandez-Capetillo, O., H. Chen, A. Celeste, I. Ward, P.J. Romanienko, J.C. Morales, K. Naka, Z. Xia, R.D. Camerini-Otero, N. Motoyama, P.B. Carpenter, W.M. Bonner, J. Chen und A. Nussenzweig, (2002). "DNA damage-induced G2-M checkpoint activation by histone H2AX and 53BP1." Nat Cell Biol **4**(12): 993-7.
- Fleischmann, D., (2003). "Use of high-concentration contrast media in multiple-detector-row CT: principles and rationale." Eur Radiol **13 Suppl 5**M14-20.
- Foster, E.R. und J.A. Downs, (2005). "Histone H2A phosphorylation in DNA double-strand break repair." FEBS J **272**(13): 3231-40.
- Frankenberg-Schwager, M., (1990). "Induction, repair and biological relevance of radiation-induced DNA lesions in eukaryotic cells." Radiat Environ Biophys **29**(4): 273-92.
- Friedberg, E.C., (1995). "Out of the shadows and into the light: the emergence of DNA repair." Trends Biochem Sci **20**(10): 381.
- Friedberg, E.C., (2003). "DNA damage and repair." Nature **421**(6921): 436-40.

- Friedberg, E.C., G.C. Walker, W. Siede, (2007). DNA Repair and Mutagenesis. Washington, D.C., ASM Press.
- Fuchs, V.R. und H.C.J. Sox, (2001). "Physicians' views of the relative importance of thirty medical innovations." Health Aff (Millwood) **20**(5): 30-42.
- Furuta, T., H. Takemura, Z. Liao, G.J. Aune, C. Redon, O.A. Sedelnikova, D.R. Pilch, E.P. Rogakou, A. Celeste, H.T. Chen, A. Nussenzweig, M.I. Aladjem, W.M. Bonner und Y. Pommier, (2003). "Phosphorylation of histone H2AX and activation of Mre11, Rad50, and Nbs1 in response to replication-dependent DNA double-strand breaks induced by mammalian DNA topoisomerase I cleavage complexes." J Biol Chem **278**(22): 20303-12.
- Geisel, D., J.T. Heverhagen, M. Kalinowski und H. Wagner, (2008). "DNA double-strand breaks after percutaneous transluminal angioplasty." Radiology **248**(3): 852-9.
- Gilbert, E.S., (2001). "Invited commentary: studies of workers exposed to low doses of radiation." Am J Epidemiol **153**(4): 319-22; discussion 323-4.
- Goodhead, D.T., (1989). "The initial physical damage produced by ionizing radiations." Int J Radiat Biol **56**(5): 623-34.
- Goodhead, D.T., (1994). "Initial events in the cellular effects of ionizing radiations: clustered damage in DNA." Int J Radiat Biol **65**(1): 7-17.
- Gradzka, I. und T. Iwanenko, (2005). "A non-radioactive, PFGE-based assay for low levels of DNA double-strand breaks in mammalian cells." DNA Repair (Amst) **4**(10): 1129-39.
- Grudzenski, S., M.A. Kuefner, M.B. Heckmann, M. Uder und M. Lobrich, (2009). "Contrast medium-enhanced radiation damage caused by CT examinations." Radiology **253**(3): 706-14.
- Gueant-Rodriguez, R., A. Romano, A. Barbaud, K. Brockow und J. Gueant, (2006). "Hypersensitivity reactions to iodinated contrast media." Curr Pharm Des **12**(26): 3359-72.
- Gumrich, K., R.P. Virsik-Peuckert und D. Harder, (1986). "Temperature and the formation of radiation-induced chromosome aberrations. I. The effect of irradiation temperature." Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med **49**(4): 665-72.
- Haaga, J.R., (2001). "Radiation dose management: weighing risk versus benefit." AJR Am J Roentgenol **177**(2): 289-91.
- Haber, J.E., (2000). "Partners and pathways repairing a double-strand break." Trends Genet **16**(6): 259-64.
- Halicka, H.D., X. Huang, F. Traganos, M.A. King, W. Dai und Z. Darzynkiewicz, (2005). "Histone H2AX phosphorylation after cell irradiation with UV-B: relationship to cell cycle phase and induction of apoptosis." Cell Cycle **4**(2): 339-45.

- Hall, D.M., G.R. Buettner, R.D. Matthes und C.V. Gisolfi, (1994). "Hyperthermia stimulates nitric oxide formation: electron paramagnetic resonance detection of.NO-heme in blood." J Appl Physiol **77**(2): 548-53.
- Hall EJ. (2000). Radiobiology for the radiologist. Philadelphia, USA, Lippincott Williams & Wilkins
- Haller, C. und I. Hizoh, (2004). "The cytotoxicity of iodinated radiocontrast agents on renal cells in vitro." Invest Radiol **39**(3): 149-54.
- Hammarsten, O., L.G. DeFazio und G. Chu, (2000). "Activation of DNA-dependent protein kinase by single-stranded DNA ends." J Biol Chem **275**(3): 1541-50.
- Hansen, J.C., (2002). "Conformational dynamics of the chromatin fiber in solution: determinants, mechanisms, and functions." Annu Rev Biophys Biomol Struct **31**361-92.
- Herzog, P. und C.T. Rieger, (2004). "Risk of cancer from diagnostic X-rays." Lancet **363**(9406): 340-1.
- Hewitson, T.D., T. Bisucci und I.A. Darby, (2006). "Histochemical localization of apoptosis with in situ labeling of fragmented DNA." Methods Mol Biol **326**227-34.
- Higgins, N.P., K. Kato und B. Strauss, (1976). "A model for replication repair in mammalian cells." J Mol Biol **101**(3): 417-25.
- Hill, M.A., (2004). "The variation in biological effectiveness of X-rays and gamma rays with energy." Radiat Prot Dosimetry **112**(4): 471-81.
- Holley, W.R. und A. Chatterjee, (1996). "Clusters of DNA induced by ionizing radiation: formation of short DNA fragments. I. Theoretical modeling." Radiat Res **145**(2): 188-99.
- Huang, X., H.D. Halicka, F. Traganos, T. Tanaka, A. Kurose und Z. Darzynkiewicz, (2005). "Cytometric assessment of DNA damage in relation to cell cycle phase and apoptosis." Cell Prolif **38**(4): 223-43.
- Hutchinson, F., (1985). "Chemical changes induced in DNA by ionizing radiation." Prog Nucleic Acid Res Mol Biol **32**115-54.
- Iliakis, G., (1991). "The role of DNA double strand breaks in ionizing radiation-induced killing of eukaryotic cells." Bioessays **13**(12): 641-8.
- Ismail, I.H. und M.J. Hendzel, (2008). "The gamma-H2A.X: is it just a surrogate marker of double-strand breaks or much more?" Environ Mol Mutagen **49**(1): 73-82.
- Jackson, S.P., (2002). "Sensing and repairing DNA double-strand breaks." Carcinogenesis **23**(5): 687-96.
- Jakob, B., M. Scholz und G. Taucher-Scholz, (2003). "Biological imaging of heavy charged-particle tracks." Radiat Res **159**(5): 676-84.

- Joiner, M.C., B. Marples, P. Lambin, S.C. Short und I. Turesson, (2001).
 "Low-dose hypersensitivity: current status and possible mechanisms."
Int J Radiat Oncol Biol Phys **49**(2): 379-89.
- Joubert, A., M. Biston, C. Boudou, J. Ravanat, T. Brochard, A. Charvet, F. Esteve,
 J. Balosso und N. Foray, (2005). "Irradiation in presence of iodinated contrast
 agent results in radiosensitization of endothelial cells: consequences for
 computed tomography therapy." Int J Radiat Oncol Biol Phys **62**(5): 1486-96.
- Jovanovic, M. und W.S. Dynan, (2006). "Terminal DNA structure and ATP influence
 binding parameters of the DNA-dependent protein kinase at an early step prior
 to DNA synapsis." Nucleic Acids Res **34**(4): 1112-20.
- Kampinga, H.H. und A. Laszlo, (2005). "DNA double strand breaks do not play a role in
 heat-induced cell killing." Cancer Res **65**(22): 10632-3; author reply 10633.
- Kampinga, H.H., Y.S. Hiemstra, A.W. Konings und E. Dikomey, (1997). "Correlation
 between slowly repairable double-strand breaks and thermal radiosensitization
 in the human HeLa S3 cell line." Int J Radiat Biol **72**(3): 293-301.
- Kaneko, H., K. Igarashi, K. Kataoka und M. Miura, (2005). "Heat shock induces
 phosphorylation of histone H2AX in mammalian cells."
Biochem Biophys Res Commun **328**(4): 1101-6.
- Karran, P., (2000). "DNA double strand break repair in mammalian cells."
Curr Opin Genet Dev **10**(2): 144-50.
- Kauffmann, G.W., E. Moser, R. Sauter (2006). Radiologie. Urban & Fischer, 3. Auflage
- Khanna, K.K. und S.P. Jackson, (2001). "DNA double-strand breaks: signaling, repair and
 the cancer connection." Nat Genet **27**(3): 247-54.
- Kim, S.H., J.H. Kim und E.W. Hahn, (1976). "The enhanced killing of irradiated HeLa
 cells in synchronous culture by hyperthermia." Radiat Res **66**(2): 337-45.
- Kinner, A., W. Wu, C. Staudt und G. Iliakis, (2008a). "Gamma-H2AX in recognition and
 signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin."
Nucleic Acids Res **36**(17): 5678-94.
- Kinner, A., W. Wu, C. Staudt und G. Iliakis, (2008b). "Gamma-H2AX in recognition and
 signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin."
Nucleic Acids Res **36**(17): 5678-94.
- Kornberg, R.D., (1974). "Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA."
Science **184**(139): 868-71.
- Kraft, G., M. Kramer und M. Scholz, (1992). "LET, track structure and models.
 A review." Radiat Environ Biophys **31**(3): 161-80.
- Krogh, B.O. und L.S. Symington, (2004). "Recombination proteins in yeast."
Annu Rev Genet **38**: 233-71.

- Kuhne, M., E. Riballo, N. Rief, K. Rothkamm, P.A. Jeggo und M. Lobrich, (2004).
 "A double-strand break repair defect in ATM-deficient cells contributes to radiosensitivity." Cancer Res **64**(2): 500-8.
- Lentle, B. und J. Aldrich, (1997). "Radiological sciences, past and present."
Lancet **350**(9073): 280-5.
- Lett, J.T., (1990). "Damage to DNA and chromatin structure from ionizing radiations, and the radiation sensitivities of mammalian cells."
Prog Nucleic Acid Res Mol Biol **39**305-52.
- Lieber, M.R., (2008). "The mechanism of human nonhomologous DNA end joining."
J Biol Chem **283**(1): 1-5.
- Lobrich, M. und J. Kiefer, (2006). "Assessing the likelihood of severe side effects in radiotherapy." Int J Cancer **118**(11): 2652-6.
- Lobrich, M., B. Rydberg und P.K. Cooper, (1995). "Repair of x-ray-induced DNA double-strand breaks in specific Not I restriction fragments in human fibroblasts: joining of correct and incorrect ends." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(26): 12050-4.
- Lobrich, M., N. Rief, M. Kuhne, M. Heckmann, J. Fleckenstein, C. Rube und M. Uder, (2005). "In vivo formation and repair of DNA double-strand breaks after computed tomography examinations."
Proc Natl Acad Sci U S A **102**(25): 8984-9.
- Luger, K., (2003). "Structure and dynamic behavior of nucleosomes."
Curr Opin Genet Dev **13**(2): 127-35.
- Luger, K., A.W. Mader, R.K. Richmond, D.F. Sargent und T.J. Richmond, (1997).
 "Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution."
Nature **389**(6648): 251-60.
- Ma, Y., U. Pannicke, K. Schwarz und M.R. Lieber, (2002). "Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination." Cell **108**(6): 781-94.
- MacLeod, R.A., A.F. Christie, N.D. Costa und P.E. Bryant, (1990). "Repair kinetics in CHO cells of X-ray induced DNA damage and chromatid aberrations during a cell cycle extended by transient hypothermia." Mutagenesis **5**(3): 279-83.
- Mannironi, C., W.M. Bonner und C.L. Hatch, (1989). "H2A.X. a histone isoprotein with a conserved C-terminal sequence, is encoded by a novel mRNA with both DNA replication type and polyA 3' processing signals."
Nucleic Acids Res **17**(22): 9113-26.
- Marti, T.M., E. Hefner, L. Feeney, V. Natale und J.E. Cleaver, (2006).
 "H2AX phosphorylation within the G1 phase after UV irradiation depends on nucleotide excision repair and not DNA double-strand breaks."
Proc Natl Acad Sci U S A **103**(26): 9891-6.

- Martin, C.J., (2008). "Radiation dosimetry for diagnostic medical exposures." Radiat Prot Dosimetry **128**(4): 389-412.
- Matsubara, S., S. Suzuki, H. Suzuki, Y. Kuwabara und T. Okano, (1982). "Effects of contrast medium on radiation-induced chromosome aberrations." Radiology **144**(2): 295-301.
- McGlynn, P. und R.G. Lloyd, (2002). "Recombinational repair and restart of damaged replication forks." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(11): 859-70.
- Meek, K., S. Gupta, D.A. Ramsden und S.P. Lees-Miller, (2004). "The DNA-dependent protein kinase: the director at the end." Immunol Rev **200**:132-41.
- Michel, B., M.J. Flores, E. Viguera, G. Grompone, M. Seigneur und V. Bidnenko, (2001). "Rescue of arrested replication forks by homologous recombination." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(15): 8181-8.
- Mould, R.F., (1995). "Invited review: Rontgen and the discovery of X-rays." Br J Radiol **68**(815): 1145-76.
- Mould, R.F., (1998). "The discovery of radium in 1898 by Maria Sklodowska-Curie (1867-1934) and Pierre Curie (1859-1906) with commentary on their life and times." Br J Radiol **71**(852): 1229-54.
- Mountford, P.J. und D.H. Temperton, (1992). "Recommendations of the International Commission on Radiological Protection (ICRP) 1990." Eur J Nucl Med **19**(2): 77-9.
- Nagasawa, H. und J.B. Little, (1992). "Induction of sister chromatid exchanges by extremely low doses of alpha-particles." Cancer Res **52**(22): 6394-6.
- Nagasawa, H. und J.B. Little, (1999). "Unexpected sensitivity to the induction of mutations by very low doses of alpha-particle radiation: evidence for a bystander effect." Radiat Res **152**(5): 552-7.
- Nevaldine, B., J.A. Longo und P.J. Hahn, (1994). "Hyperthermia inhibits the repair of DNA double-strand breaks induced by ionizing radiation as determined by pulsed-field gel electrophoresis." Int J Hyperthermia **10**(3): 381-8.
- Nickoloff, E.L. und P.O. Alderson, (2001). "Radiation exposures to patients from CT: reality, public perception, and policy." AJR Am J Roentgenol **177**(2): 285-7.
- Niewolik, D., U. Pannicke, H. Lu, Y. Ma, L.V. Wang, P. Kulesza, E. Zandi, M.R. Lieber und K. Schwarz, (2006). "DNA-PKcs dependence of Artemis endonucleolytic activity, differences between hairpins and 5' or 3' overhangs." J Biol Chem **281**(45): 33900-9.
- Norman, A., F.H. Adams und R.F. Riley, (1978). "Cytogenetic effects of contrast media and triiodobenzoic acid derivatives in human lymphocytes." Radiology **129**(1): 199-203.

- Norman, A., S.T. Cochran und J.W. Sayre, (2001). "Meta-analysis of increases in micronuclei in peripheral blood lymphocytes after angiography or excretory urography." Radiat Res **155**(5): 740-3.
- Obe, G., C. Johannes und D. Schulte-Frohlinde, (1992). "DNA double-strand breaks induced by sparsely ionizing radiation and endonucleases as critical lesions for cell death, chromosomal aberrations, mutations and oncogenic transformation." Mutagenesis **7**(1): 3-12.
- Ohnishi, K. und T. Ohnishi, (2001). "Heat-induced p53-dependent signal transduction and its role in hyperthermic cancer therapy." Int J Hyperthermia **17**(5): 415-27.
- Pages, V. und R.P.P. Fuchs, (2002). "How DNA lesions are turned into mutations within cells?" Oncogene **21**(58): 8957-66.
- Paques, F. und J.E. Haber, (1999). "Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*." Microbiol Mol Biol Rev **63**(2): 349-404.
- Paull, T.T., E.P. Rogakou, V. Yamazaki, C.U. Kirchgessner, M. Gellert und W.M. Bonner, (2000). "A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage." Curr Biol **10**(15): 886-95.
- Peterson, C.L. und M. Laniel, (2004). "Histones and histone modifications." Curr Biol **14**(14): R546-51.
- Pilch, D.R., O.A. Sedelnikova, C. Redon, A. Celeste, A. Nussenzweig und W.M. Bonner, (2003). "Characteristics of gamma-H2AX foci at DNA double-strand breaks sites." Biochem Cell Biol **81**(3): 123-9.
- Pirker, E., (1996). "Hundert Jahre Rontgenstrahlen. Der Beitrag osterreichischer Wissenschaftler zu ihrer Entdeckung und Nutzung." Wien Klin Wochenschr **108**(1): 1-4.
- Prakash, L., (1981). "Characterization of postreplication repair in *Saccharomyces cerevisiae* and effects of rad6, rad18, rev3 and rad52 mutations." Mol Gen Genet **184**(3): 471-8.
- Prakash, S. und L. Prakash, (2002). "Translesion DNA synthesis in eukaryotes: a one- or two-polymerase affair." Genes Dev **16**(15): 1872-83.
- Prise, K.M., O.V. Belyakov, M. Folkard und B.D. Michael, (1998). "Studies of bystander effects in human fibroblasts using a charged particle microbeam." Int J Radiat Biol **74**(6): 793-8.
- Raaphorst, G.P., C.E. Ng und D.P. Yang, (1999). "Thermal radiosensitization and repair inhibition in human melanoma cells: a comparison of survival and DNA double strand breaks." Int J Hyperthermia **15**(1): 17-27.
- Redon, C., D. Pilch, E. Rogakou, O. Sedelnikova, K. Newrock und W. Bonner, (2002). "Histone H2A variants H2AX and H2AZ." Curr Opin Genet Dev **12**(2): 162-9.

- Redpath, J.L. und R.J. Antoniono, (1995). "Reduced temperature (22 degrees C) results in enhancement of cell killing and neoplastic transformation in noncycling HeLa x skin fibroblast human hybrid cells irradiated with low-dose-rate gamma radiation." Radiat Res **144**(1): 102-6.
- Reiser M., FP. Kuhn, J. Debus (2004). Radiologie. MLP Duale Reihe, Thieme
- Rich, T., R.L. Allen und A.H. Wyllie, (2000). "Defying death after DNA damage." Nature **407**(6805): 777-83.
- Richmond, T.J. und C.A. Davey, (2003). "The structure of DNA in the nucleosome core." Nature **423**(6936): 145-50.
- Riley, P.A., (1994). "Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation." Int J Radiat Biol **65**(1): 27-33.
- Rogakou, E.P., C. Boon, C. Redon und W.M. Bonner, (1999). "Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo." J Cell Biol **146**(5): 905-16.
- Rogakou, E.P., D.R. Pilch, A.H. Orr, V.S. Ivanova und W.M. Bonner, (1998). "DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139." J Biol Chem **273**(10): 5858-68.
- Rogakou, E.P., W. Nieves-Neira, C. Boon, Y. Pommier und W.M. Bonner, (2000). "Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2AX histone at serine 139." J Biol Chem **275**(13): 9390-5.
- Röntgen, W.C., (1895) "Über eine neue Art von Strahlen (Vorläufige Mitteilung)." Sitzungsbericht der Physikalisch-medizinischen Gesellschaft zu Würzburg **9**: 132-141.
- Rothkamm, K. und M. Lobrich, (2003a). "Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(9): 5057-62.
- Rothkamm, K., I. Kruger, L.H. Thompson und M. Lobrich, (2003b). "Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle." gvMol Cell Biol **23**(16): 5706-15.
- Rothkamm, K., S. Balroop, J. Shekhdar, P. Fernie und V. Goh, (2007). "Leukocyte DNA damage after multi-detector row CT: a quantitative biomarker of low-level radiation exposure." Radiology **242**(1): 244-51.
- Roti Roti, J.L., (2008). "Cellular responses to hyperthermia (40-46 degrees C): cell killing and molecular events." Int J Hyperthermia **24**(1): 3-15.
- Roti Roti, J.L., R.K. Pandita, J.D. Mueller, P. Novak, E.G. Moros und A. Laszlo, (2010). "Severe, short-duration (0-3 min) heat shocks (50-52 degrees C) inhibit the repair of DNA damage." Int J Hyperthermia **26**(1): 67-78.

- Rube, C.E., S. Grudzenski, M. Kuhne, X. Dong, N. Rief, M. Lobrich und C. Rube, (2008). "DNA double-strand break repair of blood lymphocytes and normal tissues analysed in a preclinical mouse model: implications for radiosensitivity testing." Clin Cancer Res **14**(20): 6546-55.
- Rydberg, B., (1996). "Clusters of DNA damage induced by ionizing radiation: formation of short DNA fragments. II. Experimental detection." Radiat Res **145**(2): 200-9.
- Sedelnikova, O.A., A. Nakamura, O. Kovalchuk, I. Koturbash, S.A. Mitchell, S.A. Marino, D.J. Brenner und W.M. Bonner, (2007). "DNA double-strand breaks form in bystander cells after microbeam irradiation of three-dimensional human tissue models." Cancer Res **67**(9): 4295-302.
- Sedelnikova, O.A., E.P. Rogakou, I.G. Panyutin und W.M. Bonner, (2002). "Quantitative detection of (125)IdU-induced DNA double-strand breaks with gamma-H2AX antibody." Radiat Res **158**(4): 486-92.
- Seibert, J.A. und J.M. Boone, (2005). "X-ray imaging physics for nuclear medicine technologists. Part 2: X-ray interactions and image formation." J Nucl Med Technol **33**(1): 3-18.
- Seibert, J.A., (2004). "X-ray imaging physics for nuclear medicine technologists. Part 1: Basic principles of x-ray production." J Nucl Med Technol **32**(3): 139-47.
- SETLOW, R.B., P.A. SWENSON und W.L. CARRIER, (1963). "THYMINE DIMERS AND INHIBITION OF DNA SYNTHESIS BY ULTRAVIOLET IRRADIATION OF CELLS." Science **142**1464-6.
- Shao, C., M. Folkard, B.D. Michael und K.M. Prise, (2004). "Targeted cytoplasmic irradiation induces bystander responses." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(37): 13495-500.
- Shcherbakova, P.V. und I.J. Fijalkowska, (2006). "Translesion synthesis DNA polymerases and control of genome stability." Front Biosci **11**2496-517.
- Shiloh, Y., (2003). "ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity." Nat Rev Cancer **3**(3): 155-68.
- Shivji, M.K.K. und A.R. Venkitaraman, (2004). "DNA recombination, chromosomal stability and carcinogenesis: insights into the role of BRCA2." DNA Repair (Amst) **3**(8-9): 835-43.
- Shrivastav, M., L.P. De Haro und J.A. Nickoloff, (2008). "Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice." Cell Res **18**(1): 134-47.
- Singh, J. und A. Daftary, (2008). "Iodinated contrast media and their adverse reactions." J Nucl Med Technol **36**(2): 69-74; quiz 76-7.
- Solomon, R., (2007). "Contrast-induced nephropathy: update with special emphasis on patients with diabetes." Curr Diab Rep **7**(6): 454-8.

- Sonoda, E., H. Hochegger, A. Saberi, Y. Taniguchi und S. Takeda, (2006). "Differential usage of non-homologous end-joining and homologous recombination in double strand break repair." DNA Repair (Amst) **5**(9-10): 1021-9.
- Stiff, T., M. O'Driscoll, N. Rief, K. Iwabuchi, M. Lobrich und P.A. Jeggo, (2004). "ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation." Cancer Res **64**(7): 2390-6.
- Stojic, L., R. Brun und J. Jiricny, (2004). "Mismatch repair and DNA damage signalling." DNA Repair (Amst) **3**(8-9): 1091-101.
- Stucki, M. und S.P. Jackson, (2006). "gammaH2AX and MDC1: anchoring the DNA-damage-response machinery to broken chromosomes." DNA Repair (Amst) **5**(5): 534-43.
- Sung, P. und H. Klein, (2006). "Mechanism of homologous recombination: mediators and helicases take on regulatory functions." Nat Rev Mol Cell Biol **7**(10): 739-50.
- Sung, P., L. Krejci, S. Van Komen und M.G. Sehorn, (2003). "Rad51 recombinase and recombination mediators." J Biol Chem **278**(44): 42729-32.
- Symington, L.S., (2002). "Role of RAD52 epistasis group genes in homologous recombination and double-strand break repair." Microbiol Mol Biol Rev **66**(4): 630-70, table of contents.
- Takahashi, A. und T. Ohnishi, (2005). "Does gammaH2AX foci formation depend on the Presence of DNA double strand breaks?" Cancer Lett **229**(2): 171-9.
- Takahashi, A., E. Mori und T. Ohnishi, (2010). "The foci of DNA double strand break-recognition proteins localize with gammaH2AX after heat treatment." J Radiat Res (Tokyo) **51**(1): 91-5.
- Takahashi, A., H. Matsumoto, K. Nagayama, M. Kitano, S. Hirose, H. Tanaka, E. Mori, N. Yamakawa, J. Yasumoto, K. Yuki, K. Ohnishi und T. Ohnishi, (2004). "Evidence for the involvement of double-strand breaks in heat-induced cell killing." Cancer Res **64**(24): 8839-45.
- Takahashi, A., N. Yamakawa, E. Mori, K. Ohnishi, S. Yokota, N. Sugo, Y. Aratani, H. Koyama und T. Ohnishi, (2008). "Development of thermotolerance requires interaction between polymerase-beta and heat shock proteins." Cancer Sci **99**(5): 973-8.
- Teoule, R., (1987). "Radiation-induced DNA damage and its repair." Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med **51**(4): 573-89.
- Thompson, L.H. und D. Schild, (2002). "Recombinational DNA repair and human disease." Mutat Res **509**(1-2): 49-78.
- Thomsen, H.S. und S.K. Morcos, (2003). "Contrast media and the kidney: European Society of Urogenital Radiology (ESUR) guidelines." Br J Radiol **76**(908): 513-8.

- Toprak, O., (2007). "Risk markers for contrast-induced nephropathy." Am J Med Sci **334**(4): 283-90.
- Tremethick, D.J., (2007). "Higher-order structures of chromatin: the elusive 30 nm fiber." Cell **128**(4): 651-4.
- Tripodi, D., S. Lyons und D. Davies, (1971). "Separation of peripheral leukocytes by Ficoll density gradient centrifugation." Transplantation **11**(5): 487-8.
- Uematsu, N., E. Weterings, K. Yano, K. Morotomi-Yano, B. Jakob, G. Taucher-Scholz, P. Mari, D.C. van Gent, B.P.C. Chen und D.J. Chen, (2007). "Autophosphorylation of DNA-PKCS regulates its dynamics at DNA double-strand breaks." J Cell Biol **177**(2): 219-29.
- Ulrich, H.D., (2007). "Conservation of DNA damage tolerance pathways from yeast to humans." Biochem Soc Trans **35**(Pt 5): 1334-7.
- United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation **(2000)**. UNSCEAR. "Sources and Effects of Ionizing Radiation: Report to the General Assembly, with Scientific Annexes (United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation, New York)." Band 792000, 314.
- Valerie, K. und L.F. Povirk, (2003). "Regulation and mechanisms of mammalian double-strand break repair." Oncogene **22**(37): 5792-812.
- Vamvakas, S., E.H. Vock und W.K. Lutz, (1997). "On the role of DNA double-strand breaks in toxicity and carcinogenesis." Crit Rev Toxicol **27**(2): 155-74.
- van Gent, D.C., J.H. Hoeijmakers und R. Kanaar, (2001). "Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection." Nat Rev Genet **2**(3): 196-206.
- Vilenchik, M.M., (1989). "Studies of DNA damage and repair of thermal- and radiation-induced lesions in human cells." Int J Radiat Biol **56**(5): 685-9.
- Virsik-Peuckert, R.P. und D. Harder, (1986). "Temperature and the formation of radiation-induced chromosome aberrations. II. The temperature dependence of lesion repair and lesion interaction." Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med **49**(4): 673-81.
- Wang, Z., (2001). "DNA damage-induced mutagenesis : a novel target for cancer prevention." Mol Interv **1**(5): 269-81.
- Ward, I.M. und J. Chen, (2001). "Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress." J Biol Chem **276**(51): 47759-62.
- Ward, J.F., (1988). "DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability." Prog Nucleic Acid Res Mol Biol **35**: 95-125.
- Ward, J.F., (1990). "The yield of DNA double-strand breaks produced intracellularly by ionizing radiation: a review." Int J Radiat Biol **57**(6): 1141-50.

- Ward, J.F., C.L. Limoli, P.M. Calabro-Jones und J. Aguilera, (1991). "An examination of the repair saturation hypothesis for describing shouldered survival curves." Radiat Res **127**(1): 90-6.
- WEISS, L., (1960). "Some effects of hypothermia and hypoxia on the sensitivity of HeLa cells to x-rays." Int J Radiat Biol **220**-7.
- West, M.H. und W.M. Bonner, (1980). "Histone 2A, a heteromorphous family of eight protein species." Biochemistry **19**(14): 3238-45.
- West, S.C., (2003). "Molecular views of recombination proteins and their control." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(6): 435-45.
- Whitaker, S.J., S.N. Powell und T.J. McMillan, (1991). "Molecular assays of radiation-induced DNA damage." Eur J Cancer **27**(7): 922-8.
- Widel, M., S. Jedrus, B. Lukaszczuk, K. Raczek-Zwierzycka und A. Swierniak, (2003). "Radiation-induced micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes is correlated with normal tissue damage in patients with cervical carcinoma undergoing radiotherapy." Radiat Res **159**(6): 713-21.
- Winans, L.F., W.C. Dewey und C.M. Dettor, (1972). "Repair of sublethal and potentially lethal x-ray damage in synchronous Chinese hamster cells." Radiat Res **52**(2): 333-51.
- Wu, W., C. Zhang, Z. Chen, G. Zhang und J. Yang, (2009). "Differences in heating methods may account for variation in reported effects on gammaH2AX focus formation." Mutat Res **676**(1-2): 48-53.
- Zhou, H., G. Randers-Pehrson, C.A. Waldren, D. Vannais, E.J. Hall und T.K. Hei, (2000). "Induction of a bystander mutagenic effect of alpha particles in mammalian cells." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(5): 2099-104.
- Zink, F.E., (1997). "X-ray tubes." Radiographics **17**(5): 1259-68.

Anhang

Anhang 1: Vergleich der Anzahl an γ -H2AX-Foci pro Zelle nach applizierter Röntgenstrahlung in humanen Lymphozyten bei unterschiedlichen Umgebungstemperaturen. Jeder Messwert ist der Mittelwert aus vier unabhängigen Zählungen mit jeweils mindestens 40 Zellen und 40 Foci. (Kontrastmittel=KM)

20 mGy ohne KM

	4 °C	RT	37 °C
T1	0,75	0,80	0,51
T2	0,95	1,07	0,62
T3	0,84	0,73	0,51
T4	0,71	0,66	0,55
T5	0,62	0,33	0,31

20 mGy mit KM

	4 °C	RT	37 °C
T1	0,72	0,93	1,29
T2	0,95	1,00	1,35
T3	1,04	0,88	0,90
T4	0,95	0,77	0,89
T5	0,86	0,40	0,31

100 mGy ohne KM

	4 °C	RT	37 °C
T1	1,71	1,77	1,56
T2	2,12	2,20	1,94
T3	1,43	2,05	1,52
T4	1,65	1,96	1,04
T5	1,52	0,69	0,38

100 mGy mit KM

	4 °C	RT	37 °C
T1	2,05	2,64	2,91
T2	2,63	2,59	3,18
T3	3,43	1,90	2,50
T4	2,15	1,64	2,15
T5	1,85	0,88	0,36

**200 mGy ohne
KM**

	4 °C	RT	37 °C
T1	2,59	2,94	3,43
T2	2,81	3,62	3,26
T3	2,46	3,56	2,38
T4	2,29	3,19	2,37
T5	2,08	0,79	0,56

200 mGy mit KM

	4 °C	RT	37 °C
T1	4,37	4,08	4,18
T2	4,06	4,97	5,08
T3	4,58	4,28	3,54
T4	3,16	4,08	2,87
T5	2,14	1,06	0,36

**1000 mGy ohne
KM**

	4 °C	RT	37 °C
T1	6,67	7,04	5,93
T2	6,30	7,23	6,16
T3	5,08	6,60	4,65
T4	4,35	5,06	4,75
T5	4,19	1,88	1,33

1000 mGy mit KM

	4 °C	RT	37 °C
T1	9,31	8,39	8,51
T2	7,14	7,96	8,34
T3	6,59	6,82	6,01
T4	5,32	5,91	4,91
T5	3,50	1,41	1,79

Anhang 2: Vergleichbarkeit der Formation an γ -H2AX-Foci bei unterschiedlichen Umgebungstemperaturen während der Bestrahlung ohne Kontrastmittelgabe

Bestrahlungsdosis	p - Wert, 4 °C - RT	p - Wert, 4 °C - 37 °C	p - Wert, RT - 37 °C
20 mGy T1	0,40	0,01	< 0,05
20 mGy T2	0,08	< 0,05	< 0,05
20 mGy T3	0,05	< 0,05	< 0,05
20 mGy T4	0,44	0,14	0,33
20 mGy T5			
100 mGy T1	0,64	0,37	0,19
100 mGy T2	0,38	0,04	0,02
100 mGy T3	0,02	0,47	0,04
100 mGy T4	0,09	< 0,05	< 0,05
100 mGy T5		< 0,05	
200 mGy T1	0,26	0,01	0,15
200 mGy T2	< 0,05	0,03	0,03
200 mGy T3	< 0,05	0,69	< 0,05
200 mGy T4	0,07	0,80	0,06
200 mGy T5	< 0,05	< 0,05	< 0,05
1000 mGy T1	0,64	0,15	0,17
1000 mGy T2	0,13	0,67	0,07
1000 mGy T3	0,04	0,41	< 0,05
1000 mGy T4	0,14	0,32	0,44
1000 mGy T5	< 0,05	< 0,05	0,01

Anhang 3: Vergleichbarkeit der Formation an γ -H2AX-Foci bei unterschiedlichen Umgebungstemperaturen während der Bestrahlung mit Kontrastmittelgabe

Bestrahlungsdosis	p - Wert, 4 °C - RT	p - Wert, 4 °C - 37 °C	p - Wert, RT - 37 °C
20 mGy T1	< 0,05	0,01	0,03
20 mGy T2	0,44	< 0,05	< 0,05
20 mGy T3	0,09	0,04	0,94
20 mGy T4	0,04	0,37	0,14
20 mGy T5	0,01	< 0,05	0,28
100 mGy T1	0,03	< 0,05	0,24
100 mGy T2	0,84	0,01	0,01
100 mGy T3	< 0,05	0,04	0,11
100 mGy T4	0,08	0,98	0,07
100 mGy T5	< 0,05	< 0,05	0,02
200 mGy T1	0,06	0,26	0,45
200 mGy T2	< 0,05	< 0,05	0,55
200 mGy T3	0,21	< 0,05	< 0,05
200 mGy T4	< 0,05	0,15	< 0,05
200 mGy T5	< 0,05	< 0,05	0,01
1000 mGy T1	< 0,05	0,37	0,89
1000 mGy T2	< 0,05	< 0,05	0,20
1000 mGy T3	0,62	0,08	0,12
1000 mGy T4	0,11	0,17	0,02
1000 mGy T5	< 0,05	< 0,05	0,17

Zusammenfassung

Jeder Mensch ist in seinem Leben einer gewissen Strahlendosis ausgesetzt. Diagnostische Verfahren in der Medizin bilden mit einem Anteil von ungefähr 14 % den größten vom Menschen verursachten Anteil an ionisierender Strahlung weltweit. Die effektive Dosis beträgt durchschnittlich 0,4 mSv pro Jahr. Die Computertomographie trägt den größten Teil zur jährlichen Gesamtdosis bei. Ionisierende Strahlung kann über verschiedene Schäden an der DNA zur Entstehung von Leukämie und anderen Krebserkrankungen führen. DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) zählen dabei zu den bedeutendsten Schäden, die die Karzinogenese initiieren können.

Darüber hinaus benötigen viele bildgebende Verfahren die Verwendung jodhaltiger Kontrastmittel, deren Nieren- und zytotoxischen Effekte teilweise bereits bekannt sind. Allerdings gibt es kaum Studien darüber, ob die Verwendung jodhaltiger Kontrastmittel einen Einfluss auf die Entstehung und Reparatur von DNA-Schäden hat, die durch diagnostische Röntgenstrahlung verursacht wurden.

Obwohl in letzter Zeit bereits Hitze-induzierte γ -H2AX-Foci beschrieben wurden, sind Studien über den Einfluss unterschiedlicher Temperaturen auf die Induktion und Reparatur von Strahlen induzierten DSB selten und widersprüchlich. Besonders wenige Forschungsergebnisse existieren über die Kombination von Bestrahlung und hypothermischen Temperaturen.

Durch die Quantifizierung von γ -H2AX-Foci mittels Immunfluoreszenzfärbung konnte die Nachweisgrenze von DNA-Doppelstrangbrüchen nach Einwirken ionisierender Strahlung von einigen Gray auf einige mGray gesenkt werden. In Studien wurde gezeigt, dass dieses Verfahren in vivo bei Lymphozyten anwendbar ist und der Verlust von γ -H2AX-Foci mit der Reparatur der DSB korreliert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zur Quantifizierung von DNA-Doppelstrangbrüchen die Darstellung der γ -H2AX-Foci durch Immunfluoreszenz gewählt. Ich führte die Versuche bei Raumtemperatur, 4 °C und 37 °C, jeweils mit und ohne Kontrastmittel durch. Um Aussagen über die Korrelation von Strahlendosis und der Induktion von DSB treffen zu können wurden humane Lymphozyten pro Versuchsreihe in vitro mit 20 mGy,

100 mGy, 200 mGy und 1000 mGy bestrahlt. Die Lymphozyten wurden sofort, 30 min, 1 h, 2 h und 24 h nach Bestrahlung fixiert, um die Reparatur der DSB über die Zeit zu messen. Nach Immunfluoreszenzfärbung wurden die γ -H2AX-Foci mikroskopisch ausgezählt. Statistische Unterschiede zwischen den Versuchen mit und ohne Kontrastmittel sowie den Versuchen bei unterschiedlichen Temperaturen wurden mit Hilfe des T-Testes ermittelt. Bei einem Wert von $p < 0,05$ wurden die Unterschiede als statistisch signifikant angesehen.

Der lineare Zusammenhang zwischen der Strahlendosis und der Formation der γ -H2AX-Foci, der in dieser Arbeit gefunden wurde, deckt sich mit den Ergebnissen anderer Studien, in denen bereits dasselbe Verfahren zum Nachweis von DSB nach Bestrahlung in vitro und in vivo angewendet wurde. Es zeigte sich, vergleichbar mit den Resultaten vorausgehender in vitro und in vivo Versuche, ein Rückgang der Foci bis 24 h nach Bestrahlung. Weiter konnte ich nachweisen, dass die Abnahme der Focizahl bis 24 h nach Bestrahlung höher war je mehr Foci initial gemessen wurden. Nach 24 h fanden sich abhängig von dem jeweiligen Versuch noch immer erhöhte Focilevel.

Bei den Versuchen mit Applikation von jodiertem Kontrastmittel während der Bestrahlung konnte ich nachweisen, dass die Formation der DSB bei Anwesenheit von Kontrastmittel gesteigert wurde. Zusätzlich zeigten die Ergebnisse, dass die Reparatorkapazität bei den Versuchen mit Kontrastmittel nicht eingeschränkt war.

Bei den verschiedenen Versuchen konnte ich wichtige Unterschiede bei der Induktion und Reparatur der DSB in Abhängigkeit der jeweiligen Temperatur bei Bestrahlung finden. Die Resultate zeigten, dass die Entstehung der γ -H2AX-Foci bei niedrigen Temperaturen verzögert war. Die eingeschränkte Reparaturkapazität bestätigte sich bei der Auszählung der Foci 24 h nach Bestrahlung. Es fanden sich unabhängig von der Kontrastmittelgabe die höchsten Focizahlen für die Bestrahlung bei 4 °C.

Meine Ergebnisse zeigten einen linearen Anstieg der DSB mit steigender Strahlendosis gefolgt von einem kontinuierlichen Rückgang der γ -H2AX-Foci bis 24 h nach Bestrahlung. Je höher die Focizahl initial war, desto schneller war auch die Reparatur der DSB. Dies führt zu der Überlegung, ob die Reparaturkapazität bei verschiedenen Strahlendosen unterschiedlich ist und sollte in zukünftigen Studien überprüft werden. Als mögliche Ursachen der persistierenden DSB 24 h nach Bestrahlung müssen Effekte

wie Apoptoseprozesse, der sogenannte „Bystander“ Effekt und „Low-dose hypersensitivity“ Beachtung finden.

Die Versuche mit jodiertem Kontrastmittel zeigten, dass die Formation der DSB bei Anwesenheit von Kontrastmittel gesteigert wurde. Dieser Effekt beruht wahrscheinlich auf der Generierung sekundärer Auger-Elektronen durch die Absorption der Röntgenstrahlung durch das Kontrastmittel. Diese Elektronen sind die Hauptursache der DNA-Schäden durch ionisierende Strahlung. Zwar zeigt sich keine Einschränkung der Reparatursfähigkeit durch das Kontrastmittel, trotzdem sollten die Resultate dieser Arbeit dazu führen, dass die Verwendung jodhaltiger Kontrastmittel noch vorsichtiger als bisher überdacht wird. Zukünftige Studien sollen überprüfen, ob der hier beobachtete Einfluss von Kontrastmittel auch in vivo gefunden werden kann.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass die Entstehung der γ -H2AX-Foci bei niedrigen Temperaturen verzögert war. Dies kann möglicherweise dadurch erklärt werden, dass bei niedrigeren Temperaturen die enzymatische Aktivität von Reparaturproteinen gesenkt wird. In Zusammenschau mit vorausgehenden Studien, die wachsende γ -H2AX-Foci bei Hyperthermie (45-47 °C) demonstrieren konnten, ergibt sich ein Temperaturbereich zwischen Hyperthermie und Hypothermie (< 37 °C), in dem die initiale Induktion der Foci am geringsten ist und damit die durch Strahlung induzierten Schäden an der DNA. Nach 24 h zeigten sich unabhängig von der Kontrastmittelgabe noch immer erhöhte Focizahlen bei den Versuchen bei 4 °C. Aus diesen Ergebnissen schließe ich, dass je niedriger die Temperatur bei Bestrahlung, desto eingeschränkter die Reparatur der DSB ist. Sollten sich diese Ergebnisse bei Versuchen in vivo bestätigen, können niedrige Temperaturen zu genomischen Instabilitäten und Mutationen führen. Wenn Reparaturenzyme bei bestimmten Temperaturen effizienter arbeiten, sollte dies in der radiologischen Diagnostik Beachtung finden und die Bedingungen während der Bestrahlung sollten entsprechend angepasst werden.

Summary

Every person is frequently exposed to ionizing radiation. Diagnostic x-ray procedures present the largest man-made source of ionizing radiation exposure to humans that contributes about 14 % of the total annual exposure. The effective dose amounts to an average of 0.4 mSv per year. The largest contribution to this medical x-ray dose is made by computed tomography. Ionizing radiation can cause leukemia and other kinds of cancer through various damages to the DNA. DNA double-strand breaks (DSBs) are among the most significant damages that can initiate carcinogenesis.

In addition, many imaging applications require the use of iodinated contrast agents. Nephro- and cytotoxic effects of these contrast agents are already known. However, there are only few studies on whether the use of contrast agents has an additional influence on the formation and repair of DNA damage which is caused by the exposure to diagnostic x-rays.

Although heat-induced γ -H2AX foci have been described recently, studies about the influence of temperature on the induction and repair of radiation-induced DSBs are rare and contradictory. Especially few research results exist about the combination of ionizing radiation and hypothermic temperatures.

Through the quantification of γ -H2AX foci via fluorescence microscopy it has become possible to lower the limit of detection of DNA double-strand breaks after exposure to ionizing radiation, from about one Gray to about one mGray. Studies have shown that this method is applicable in vivo in lymphocytes and that the disappearance of foci correlates to the repair of DSBs.

As part of this work for the quantification of DNA double-strand breaks I used the depiction of γ -H2AX foci via immunofluorescence. I performed the experiments at room temperature, 4 °C and 37 °C, each with and without contrast agent. To be able to make statements about the correlation of the radiation dose and the induction of DSBs, human lymphocytes were radiated in vitro with 20 mGy, 100 mGy, 200 mGy and 1000 mGy per experimental series. To measure the repair of the DSBs over the time, the lymphocytes were fixed immediately, 30 min, 1 h, 2 h and 24 h after radiation.

After immunofluorescence staining γ -H2AX foci were counted microscopically. Statistical differences between the experiments with and without contrast agent as well as the experiments at different temperatures were determined by using an independent sample t-test. These differences were considered to be statistically significant when p was smaller than 0.05.

The linear coherency between radiation dose and the formation of γ -H2AX foci, which was found in this work is comparable with the results of other studies in which the same method for the detection of DSBs after radiation was already used in vitro and in vivo. A decrease of foci within 24 h after radiation was found, comparable with the results of prior in vitro and in vivo experiments. Furthermore I was able to prove, that the decrease of foci within 24 h after radiation was more noticeable if more foci were detected initially. After 24 h I could still find an elevated level of foci, depending on the particular experiment.

At the experiments with the application of iodinated contrast agent, I was able to prove that the formation of DSBs was increased if contrast agent was present during radiation. In addition, the results showed that the repair capacity in the experiments with contrast agent was not restricted.

I was able to find important differences in the induction and repair of DSBs in the experiments depending on the temperature during the radiation. The results showed that the formation of γ -H2AX foci was decelerated at low temperatures. The limited damage repair capacity was confirmed at counting foci 24 h after radiation. Independent of the application of contrast agent, the highest foci levels were found at radiation at 4 °C.

My results demonstrated a linear increase in the DSBs at rising radiation dose followed by a continuous decrease of γ -H2AX foci until 24 h after radiation. The higher the level of foci was initially, the faster was the reparation of the DSBs. This leads to the consideration whether the repair capacity is different at different radiation doses and this should be examined in future studies. As possible causes for the persistent DSBs 24 h after radiation effects like apoptotic processes, the so-called "bystander" effect and low-dose hypersensitivity must find attention.

The experiments with iodinated contrast agent showed that the formation of DSBs was increased at the presence of contrast agent. This effect is probably caused by the generation of secondary Auger electrons through the absorption of x-rays by the contrast agent. These electrons are the main cause of DNA damage by ionizing radiation. Although the repair capacity does not appear to be restricted by the contrast agent, the results of this work should lead to an even more careful consideration of the use of iodinated contrast agent. Future studies should examine whether the observed effect of this contrast agent can be found in vivo as well.

The results of this work have shown that the formation of γ -H2AX foci was delayed at low temperatures. This can be possibly explained by the fact that the enzymatic activity of repair proteins is reduced at lower temperatures. In combination with previous studies which could demonstrate increasing γ -H2AX foci at hyperthermia (45-47 °C), the initial induction of the foci and also the radiation-induced damage to the DNA is lowest at a temperature range between hyperthermia and hypothermia (< 37 °C). In the experiments at 4 °C raised levels of foci could still be proved after 24 h, regardless of the contrast agent. From these results I conclude that the lower the temperature is during radiation, the more limited is the repair of the DSBs. Should these results be confirmed in experiments in vivo, low temperatures can lead to genomic instabilities and mutations. If repair enzymes work more efficiently at certain temperatures this should find attention in the radiological diagnostics and the conditions during radiation should accordingly be adapted.

Lebenslauf

30.05.1983	Geburt als 1. Kind von Anneliese Eble (geborene Roth) und Wolfgang Eble in Tübingen
1989 – 1991	Römerschule, Strassdorf (Grundschule)
1991 – 1993	Bergschule, Waldstetten (Grundschule)
09/93 - 07/99	Franz-von-Assisi Realschule, Waldstetten, Abschluss: Mittlere Reife
09/99 - 07/02	Agnes-von-Hohenstaufen-Schule, Schwäbisch Gmünd, Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
2002 – 2003	Freiwilliges Soziales Jahr am Paul-Lechler-Krankenhaus, Tübingen
10/03 – 08/05	Studium der Medizin an der Philipps-Universität Marburg, vorklinischer Teil
08/05	Physikum
08/05 - 06/10	Studium der Medizin an der Philipps-Universität Marburg, klinischer Teil
06/07 – 01/09	Experimenteller Teil der Doktorarbeit an der Philipps-Universität Marburg
02/09 – 01/10	Praktisches Jahr 1. Tertial Abteilung für Innere Medizin, Universitätsklinikum Gießen und Marburg, Standort Marburg 2. Tertial Abteilung für Chirurgie, 1. Teil: Charles S. Curtis Memorial Hospital, Neufundland (Kanada) 2. Teil: Universitätsklinikum Gießen und Marburg, Standort Marburg 3. Tertial Abteilung für Pädiatrie, Universitätsklinikum Marburg und Gießen, Standort Marburg
06/10	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren Damen/Herren in Marburg:

Vorklinischer Studienabschnitt:

Aumüller, Basler, Cetin, Daut, del Rey, Eilers, Feuser, Gemsa, Geus, Grundmann, Hasilik, Kern, Koolman, Lang, Lemansky, Lill, Liss, Löffler, Mandrek, Mueller, Neumüller, Rausch, Röhm, Röper, Seifert, Seitz, Suske, Steininger, Sundermeyer, Weihe, Westermann

Klinischer Studienabschnitt:

Aigner, Al-Fakhri, Alter, Arnold, Bals, Barth, Baum, Bauer, Baumann, Berger, Bien, Boekhoff, Büch, Burchert, Christiansen, Czubayko, Dominguez, Donner-Banzhoff, Engenhardt-Cabillic, Fuchs-Winkelmann, Funck, Geks, Görg, Gress, Grimm, Gudermann, Happle, Hellwig, Hertl, Herzum, Höffken, Hofman, Hörle, Hoyer, Junclas, Kann, Kill, Klenk, Klose, Köhler, Köhler, Krieg, Kroll, Kuhlmann, Loff, Lohoff, Maier, Maisch, Mennel, Mittag, Mederos, Moll, Moosdorf, Müller, Neubauer, Nockher, Oeffner, Oertel, Pagenstecher, Plant, Printz, Renz, Rothmund, Ruchholtz, Schäfer, Schäfer, Schmitt, Schofer, Sesterhenn, Sommer, Stief, Strauch, Vogelmeier, Wagner, Werner, Wulf, Yu, Zemlin

Danksagung

Ganz besonders danke ich Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. physiol. Johannes T. Heverhagen und Herrn Prof. Dr. Klaus Jochen Klose für die Ermöglichung meiner Promotionsarbeit in der radiologischen Abteilung der Philipps-Universität Marburg.

Frau Beate Kleb danke ich für die Unterstützung bei der Verarbeitung der Proben und der Immunfluoreszenzfärbung.

Ebenso danke ich den Mitarbeitern der Klinik für Nuklearmedizin, insbesondere Herrn Dr. Martin Béhé, für die Ermöglichung der Mitbenutzung ihres Labors.

Zuletzt möchte ich meiner Familie und meiner besten Freundin Maria danken, die nicht nur während der Anfertigung meiner Dissertation immer für mich da waren.

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Formation und Kinetik von DNA-Doppelstrangbrüchen nach Bestrahlung in Abhängigkeit von Kontrastmittelgabe und Bestrahlungstemperatur“ in der Klinik für Strahlendiagnostik unter Leitung von Prof. Dr. med. Klaus Jochen Klose mit Unterstützung durch Herrn Prof. Dr. rer. physiol. Johannes T. Heverhagen ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Ort, Datum, Unterschrift